

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

MICHELINE PAULIN-LEVASSEUR

OBSERVATION DES STRUCTURES CONTRACTILES
DANS LE CYTOPLASME D'AMOEBA PROTEUS.

AVRIL 1982

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

A Pierre, Hugo et Julie

pour la douce complicité qui nous lie

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier monsieur Claude Gicquaud, sous la direction duquel a été menée cette recherche, pour sa constante disponibilité, son vif esprit critique et son inégalable humour. Je tiens également à remercier monsieur Julian Gruda et madame Hélène-Marie Thérien avec lesquels il a été plus qu'agréable de travailler ainsi que madame Diane Bégin pour sa précieuse aide technique.

Cette recherche a été appuyée financièrement par le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie et par la Direction générale de l'enseignement supérieur.

TABLE DES MATIERES

	<u>PAGE</u>
Introduction -----	1
1. Biochimie de la motilité -----	3
1.1 L'actine -----	3
A- Propriétés physico-chimiques de l'actine -----	3
B- L'actine d' <u>Amoeba proteus</u> -----	7
1.2 La myosine -----	8
A- Propriétés physico-chimiques de la myosine -----	8
I- Propriétés physico-chimiques de la myosine musculaire -	8
II- Propriétés physico-chimiques des myosines non musculai-	9
res -----	9
B- Activité ATPasique de la myosine -----	9
I- Activité ATPasique de la myosine du muscle strié -----	9
II- Activité ATPasique des myosines non musculaires -----	10
C- Agrégation des molécules de myosine: filaments épais -----	11
I- Filaments bipolaires de myosine dans le muscle strié --	11
II- Filaments épais de myosine non musculaire -----	11
D- Propriétés de la myosine d' <u>Amoeba proteus</u> -----	12
1.3 Microtubules et filaments de taille intermédiaire -----	13
A- Microtubules -----	13
B- Filaments de taille intermédiaire -----	13
2. Organisation des protéines contractiles -----	18
2.1 Organisation de l'actine dans le muscle strié et dans les cel-	19
lules non musculaires -----	19
A- Réseaux d'actine -----	20
B- Faisceaux d'actine -----	21
C- Organisation de l'actine dans <u>Amoeba proteus</u> -----	22
2.2 L'actomyosine -----	22
A- Actomyosine musculaire -----	22
B- Actomyosine non musculaire -----	23
C- Actomyosine d' <u>Amoeba proteus</u> -----	23
2.3 Organisation des filaments intermédiaires -----	24
3. Régulation de la contractilité -----	25
A- Mécanismes régulateurs dans les cellules musculaires -----	25
B- Mécanismes régulateurs dans les cellules non musculaires -----	26
I- Rôle probable des ions Ca^{2+} dans les mécanismes régulateurs-	26
II- Autres facteurs pouvant influencer la contractilité non mus-	31
culaire -----	31

4.	Objectif et plan de notre recherche -----	32
4.1	Influence de la phalloïdine et de la viroïdine sur le cytoplasme démembrané d' <u>Amoeba proteus</u> -----	32
4.2	Influence du pH et de l'ATP sur les structures contractiles d' <u>Amoeba proteus</u> -----	34
5.	Matériel et méthodes -----	35
5.1	Cultures d'amibes -----	35
5.2	Phalloïdine -----	35
5.3	Viroïdine -----	36
5.4	Technique de préparation du cytoplasme démembrané d' <u>Amoeba proteus</u> : préparations standard -----	36
5.5	Préparations exposées à la phalloïdine ou à la viroïdine -----	36
5.6	Effet d'une variation de pH sur le cytoplasme démembrané d' <u>Amoeba proteus</u> -----	37
5.7	Effets conjugués du pH et de l'ATP sur le cytoplasme démembrané d' <u>Amoeba proteus</u> -----	37
5.8	Décoration de l'actine par l'HMM -----	38
6.	Résultats -----	40
6.1	Préparations standard de cytoplasme démembrané -----	40
	A- Microscopie optique -----	40
	B- Microscopie électronique -----	40
6.2	Effets de la phalloïdine sur le cytoplasme d' <u>Amoeba proteus</u> ---	62
	A- Microscopie optique -----	62
	B- Microscopie électronique -----	69
6.3	Effets de la viroïdine sur le cytoplasme d' <u>Amoeba proteus</u> -----	84
	A- Microscopie optique -----	84
	B- Microscopie électronique -----	93
6.4	Décoration des filaments d'actine à la méromyosine lourde (HMM)	93
6.5	Effet d'une variation de pH sur le cytoplasme démembrané d' <u>Amoeba proteus</u> -----	110
	A- Microscopie optique -----	110
	B- Microscopie électronique -----	117

	<u>PAGE</u>
6.6 Effet de l'ATP sur le cytoplasme d' <u>Amoeba proteus</u> -----	124
A- Effet du 2,4-dinitrophénol (DNP) sur le comportement motile d' <u>Amoeba proteus</u> -----	131
B- Influence de l'ATP sur des préparations de cytoplasme réa- lisées aux pH 6.2, 7.2 et 8.2 -----	134
I- Influence de l'ATP sur des préparations à pH 6.2 -----	135
II- Influence de l'ATP sur des préparations à pH 7.2 -----	135
III- Influence de l'ATP sur des préparations à pH 8.2 -----	142
C- Influence de la phalloïdine sur des préparations réalisées aux pH 6.2, 7.2 et 8.2, avec ou sans ATP -----	153
I- Influence de la phalloïdine sur des préparations réali- sées à pH 6.2, avec ou sans ATP -----	153
II- Influence de la phalloïdine sur des préparations réali- sées à pH 7.2, avec ou sans ATP -----	154
III- Influence de la phalloïdine sur des préparations réali- sées à pH 8.2, avec ou sans ATP -----	154
D- Conclusion -----	154
7. Discussion -----	158
7.1 Avantages et inconvénients d'utiliser le cytoplasme démembrané d' <u>Amoeba proteus</u> comme modèle cellulaire -----	158
7.2 Structures contractiles observées dans les préparations stan- dard de cytoplasme démembrané d' <u>Amoeba proteus</u> -----	159
A- Aspects morphologiques des filaments de myosine -----	160
B- Structures ressemblant à des filaments d'actine décorés à l'HMM -----	163
C- Filaments de myosine dans les préparations de cytoplasme exposé à l'HMM -----	164
D- Aspect morphologique des filaments d'actine -----	164
E- Structures en forme d'"anneau" -----	167
F- Filaments de taille intermédiaire -----	167
G- Petits filaments de 3 à 4nm -----	169
H- Résumé -----	170
7.3 Effet de la phalloïdine sur les structures contractiles d' <u>Amoeba</u> <u>proteus</u> -----	171
7.4 Effet de la viroïdine sur le cytoplasme démembrané d' <u>Amoeba</u> <u>proteus</u> -----	173
7.5 Effet d'une variation de pH sur le cytoplasme démembrané d' <u>Amoeba proteus</u> -----	174
7.6 Effet conjugué du pH et de l'ATP sur le cytoplasme d' <u>Amoeba</u> <u>proteus</u> -----	176

	<u>PAGE</u>
8. Conclusion -----	180
Bibliographie -----	183

* * * *

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

	<u>PAGE</u>
Figure 1. Représentation schématique de la G-actine et de la F-actine--	4
Figure 2. Clivage enzymatique de la myosine musculaire-----	4
Figure 3. Caractéristiques structurales des filaments de myosine des muscles strié et lisse-----	16
Figure 4. Représentation schématique d'un sarcomère-----	16
Figure 5. Technique de préparation du cytoplasme démembrané d' <i>Amoeba</i> <u>proteus</u> -----	41
Figure 6. Aspect typique d'une préparation standard-----	43
Figures 7a,7b.Filaments de myosine portant des unités globulaires obser- vés dans des préparations standard-----	46
Figures 8a,8b.Filaments de myosine de type effiloché observés dans des préparations standard-----	48
Figure 9. Filament de myosine à aspect mixte observé dans une prépara- tion standard-----	50
Figure 10. Filaments d'actine décorés à l'HMM-----	53
Figure 11. Filaments d'actine ramifiés observés dans une préparation standard-----	55
Figures 12a,12b.Filaments de taille intermédiaire observés dans des pré- parations standard-----	58
Figure 13. Filaments de taille intermédiaire à proximité de débris mem- branaires observés dans des préparations standard-----	60
Figure 14. Structures en forme d'anneau observées dans une préparation standard-----	63
Figure 15. Filaments de 3nm observés dans les préparations standard----	65
Figure 16. Structures semblables à des filaments d'actine décorés à l'HMM observées dans une préparation standard-----	67
Figure 17. Cytoplasme exposé à de faibles concentrations de phalloïdine ($< 2 \times 10^{-6} M$), à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP-----	70
Figure 18. Cytoplasme exposé à $2 \times 10^{-6} M$ de phalloïdine, à pH 7.2 en pré- sence de 1mM d'ATP-----	72
Figure 19. Cytoplasme exposé à $5 \times 10^{-6} M$ de phalloïdine, à pH 7.2 en pré- sence de 1mM d'ATP-----	74
Figure 20. Cytoplasme exposé à $5 \times 10^{-6} M$ de phalloïdine, à pH 7.2 en pré- sence de 1mM d'ATP-----	76
Figure 21. Cytoplasme exposé à $5 \times 10^{-6} M$ de phalloïdine, à pH 7.2 en pré- sence de 1mM d'ATP-----	78
Figure 22. Filaments d'actine enchevêtrés dans des agrégats de matériel amorphe observés dans une préparation exposée à la phalloïdi- ne, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP-----	80

	<u>PAGE</u>
Figure 23. Filaments d'actine à proximité de débris membranaires observés dans une préparation exposée à la phalloïdine, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP-----	82
Figure 24. Cytoplasme exposé à 2×10^{-5} M de phalloïdine, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP-----	85
Figure 25. Cytoplasme exposé à 10^{-5} M de phalloïdine, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP-----	87
Figure 26. Cytoplasme exposé à 2×10^{-5} M de phalloïdine, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP-----	89
Figure 27. Cytoplasme exposé à 5×10^{-6} M de viroïdine, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP-----	94
Figure 28. Cytoplasme exposé à 5×10^{-6} M de viroïdine, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP-----	96
Figure 29. Filaments d'actine ramifiés, dans les préparations exposées à 5×10^{-6} M de viroïdine, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP--	98
Figures 30a,30b. Filaments d'actine à proximité de débris membranaires observés dans des préparations exposées à 5×10^{-6} M de viroïdine, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP-----	100
Figure 31. Filaments d'actine enchevêtrés dans des agrégats de matériel amorphe observés dans une préparation exposée à 5×10^{-6} M de viroïdine, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP-----	102
Figure 32. Aspect typique d'une préparation traitée à l'HMM-----	106
Figure 33. Polarité des filaments d'actine ramifiés, décorés à l'HMM--	108
Figure 34. Polarité des filaments d'actine à proximité de débris membranaires et décorés à l'HMM-----	111
Figures 35a,35b. Structures en bâtons observées dans des préparations traitées à l'HMM-----	113
Figure 36. Structures en bâtons observées dans une préparation traitée à l'HMM-----	115
Figures 37a,37b. Préparations réalisées à pH 6.2 en présence de 1mM d'ATP-----	118
Figure 38. Filaments de taille intermédiaire et petits filaments de 3nm observés à pH 6.2 en présence de 1mM d'ATP-----	120
Figure 39. Filaments de myosine observés à pH 6.2 en présence de 1mM d'ATP-----	122
Figures 40a,40b. Préparations réalisées à pH 8.2 en présence de 1mM d'ATP-----	125
Figure 41. Filament intermédiaire observé à pH 8.2 en présence de 1mM d'ATP-----	127
Figure 42. Changements dans le comportement motile d' <i>Amoeba proteus</i> sous l'effet du 2,4-dinitrophénol-----	132
Figures 43a,43b. Préparations réalisées à pH 6.2 en absence d'ATP-----	136

Figures 44a,44b.Préparations réalisées à pH 6.2 sans ATP exogène-----	138
Figures 45a,45b.Préparations préincubées au DNP et brisées en présence de 1mM d'ATP exogène, à pH 6.2-----	140
Figure 46. Préparation réalisée à pH 8.2 en absence d'ATP-----	143
Figures 47a,47b.Préparations réalisées à pH 8.2 en absence d'ATP-----	145
Figures 48a,48b.Préparations réalisées à pH 8.2 sans ATP exogène-----	147
Figures 49a,49b.Préparations préincubées au DNP et brisées en présence de 1mM d'ATP exogène, à pH 8.2-----	149
Figures 50a,50b.Particules globulaires observées à pH 8.2-----	151
Tableau 1. Action de la phalloïdine sur le cytoplasme d' <u>Amoeba proteus</u> , à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP-----	91
Tableau 2. Influence d'une variation de pH sur le cytoplasme d' <u>Amoeba</u> <u>proteus</u> en présence de 1mM d'ATP-----	129
Tableau 3. Action conjuguée du pH et de l'ATP sur le cytoplasme d' <u>Amoeba</u> <u>proteus</u> -----	155

* * * *

RESUME

Nous avons observé les structures contractiles présentes dans le cytoplasme démembrané d'Amoeba proteus. Nous y avons essentiellement retrouvé trois types de filaments: des filaments d'actine, des filaments de myosine et des filaments de taille intermédiaire. Nous avons mis en évidence certaines caractéristiques morphologiques particulières des filaments d'actine et des filaments de myosine dans ces préparations: filaments d'actine ramifiés et deux types morphologiquement distincts de filaments de myosine. Nous avons de plus observé d'autres structures probables de l'appareil contractile dans cette cellule: petits filaments de 3nm de diamètre, structures en forme d'"anneau"...

Nous avons étudié l'influence de la phalloïdine et de la viroïdine sur ces structures contractiles du cytoplasme démembrané d'Amoeba proteus. La phalloïdine et la viroïdine interagissent spécifiquement avec l'actine cytoplasmique. En absence de toxine, les filaments d'actine sont rares dans les préparations. Quand le cytoplasme est exposé à des concentrations de $2 \times 10^{-6} \text{M}$ et de $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de toxine, on observe de nombreux filaments d'actine arrangés en réseaux tridimensionnels. A de plus fortes concentrations de toxine, 10^{-5}M et $2 \times 10^{-5} \text{M}$, les filaments d'actine sont très nombreux et s'agrègent parallèlement en faisceaux.

Nous avons également montré l'influence du pH et de l'ATP sur les structures contractiles du cytoplasme démembrané d'Amoeba proteus. A pH 6.2 avec ATP, les filaments d'actine sont nombreux et arrangés en réseaux tridimensionnels; à pH 6.2 sans ATP, les filaments d'actine sont très nombreux et s'agrègent parallèlement en faisceaux. A pH 7.2 avec ou sans ATP, les filaments d'actine sont rares: nous croyons que, à ce pH, l'actine est en grande partie sous forme de monomères ou de petits oligomères difficilement observables en microscopie électronique. A pH 8.2 avec ATP, les filaments d'actine sont très nombreux et s'agrègent parallèlement en faisceaux; à pH 8.2 sans ATP, les filaments sont nombreux et arrangés en réseaux tridimensionnels. Nous n'avons noté aucun effet du pH et de l'ATP sur les autres structures contractiles dans le cytoplasme d'Amoeba proteus.

L'influence de la phalloïdine, de la viroïsine ainsi que celle du pH et de l'ATP sur le degré de polymérisation et l'organisation de l'actine cytoplasmique d'Amoeba proteus se traduit, en microscopie optique, par des changements dans la motilité du cytoplasme démembrané.

La phalloïdine peut donc être considérée comme un outil important dans la recherche sur la motilité cellulaire. Le pH et l'ATP sont, d'autre part, deux facteurs physiologiques potentiellement impliqués dans les mécanismes régulateurs du mouvement amiboïde.

*" We all dance round in a circle and suppose,
but the secret sits in the middle and knows "*

Robert Frost

INTRODUCTION

Depuis déjà plusieurs années, de nombreuses recherches sont menées afin de mieux comprendre les mécanismes de la motilité cellulaire. Différentes cellules animales ou végétales ont servi de matériel dans ce type d'études: cellules musculaires (Huxley, 1969; Huxley, 1973), Acanthamoeba castellanii (Weihs et Korn, 1969; Pollard et collab., 1970; Pollard et collab., 1976), Amoeba proteus (Simard - Duquesne et Couillard, 1962; Gicquaud et Couillard, 1970; Pollard et Ito, 1970; Pollard et Korn, 1971), Dictyostelium discoideum (Clarke et Spudich, 1974; Clarke et collab., 1975; Cooke et collab., 1976; Taylor et collab., 1977), Physarum polycephalum (Hatano et Oosawa, 1966; Nagai et collab., 1975; Isenberg et Wohlfarth-Bottermann, 1976; Jacobson et collab., 1976), Chara corallina (Williamson, 1975; Nagai et Hayama, 1979a; Nagai et Hayama, 1979b; Williamson et Toh, 1979), Nitella (Allen, 1974; Palevitz et collab., 1974; Allen, 1976; Palevitz, 1976).

D'importants progrès ont été ainsi réalisés dans la biochimie de la motilité. Il est maintenant, généralement, admis que des protéines cytoplasmiques semblables à l'actine et à la myosine du muscle strié sont les principales composantes moléculaires des systèmes mécano-chimiques responsables de la motilité du cytoplasme des cellules eucaryotes. Il semble également de plus en plus évident que d'autres protéines jouent un rôle important dans les processus motiles.

Nous avons choisi de mener une recherche sur les structures contractiles d'Amoeba proteus. L'étude de cette cellule présentait pour nous plusieurs avantages. Cette amibe est relativement facile à cultiver en labora-

toire. C'est une "grosse" cellule: cette caractéristique facilite les observations menées en microscopie optique. Le mouvement amiboïde représente un type de mouvement commun à plusieurs autres cellules telles que, par exemple, les leucocytes (Stossel, 1974) et les macrophages (Bhisey et Freed, 1971): il suscite donc un intérêt particulier.

Il nous a semblé important, avant d'exposer notre démarche, de rappeler brièvement les principales caractéristiques des protéines cytoplasmiques impliquées dans la motilité, que ce soit en permettant le mouvement (contraction musculaire, courant protoplasmique, mouvements flagellaires et ciliaires, phagocytose, pinocytose, ...) ou en maintenant l'intégrité structurale de la cellule c'est-à-dire en constituant un cytosquelette (forme de la cellule, consistance cytoplasmique, topographie de la surface membranaire). Nous distinguerons généralement ici ces deux rôles en désignant le premier comme une fonction contractile, essentiellement liée au mouvement, et le second comme une fonction cytosquelettique. Nous soulignerons de façon particulière les informations obtenues sur l'ultrastructure d'Amoeba proteus lors de recherches antérieures.

Nous n'avons pas trouvé utile, d'autre part, d'exposer ici les théories ou modèles théoriques sur le mouvement amiboïde. Plusieurs modèles sont basés sur la contractilité du cytoplasme dans les amibes: modèles de contraction frontale (Allen, 1972), modèles de la contraction dans la queue (Jahn et Bovee, 1969; Rinaldi et Baker, 1969), etc. Cette approche théorique, bien qu'intéressante, n'est pas essentielle à la compréhension de notre démarche expérimentale.

1. Biochimie de la motilité

1.1 L'actine

On retrouve l'actine musculaire sous deux formes: une forme monomérique, globulaire, que l'on appelle la G-actine et une forme polymérique, filamenteuse, la F-actine. La G-actine a la propriété de polymériser en une double hélice pour former un filament torsadé, la F-actine (Figure 1).

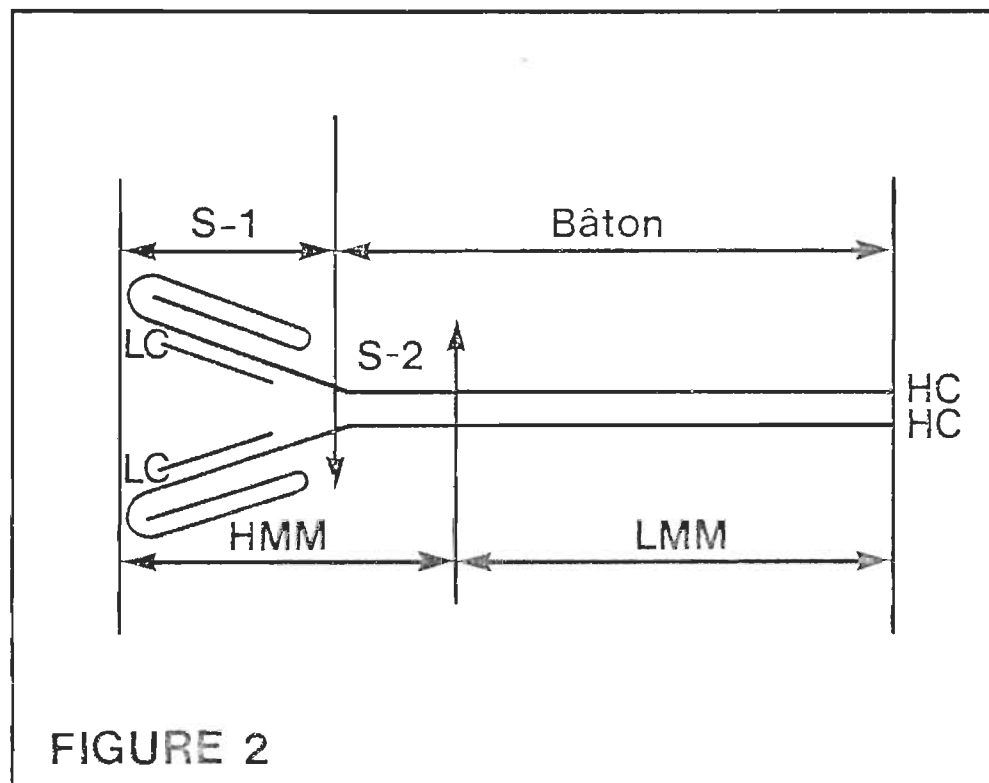
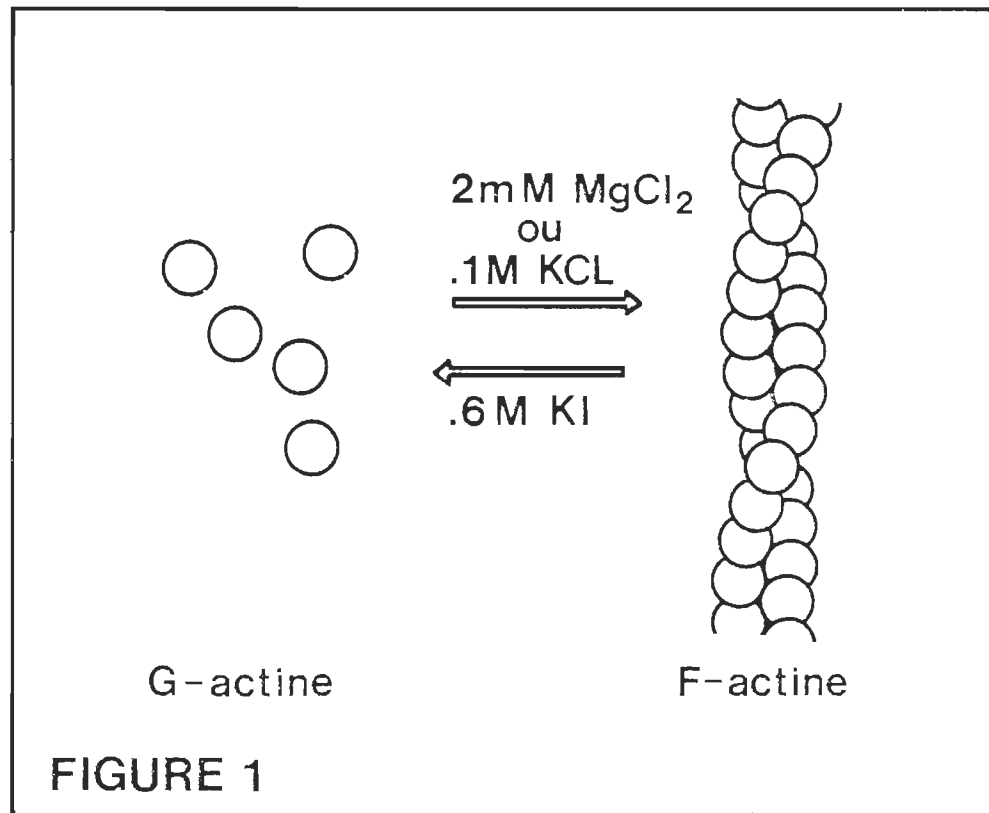
On a isolé l'actine cytoplasmique de plusieurs cellules (revues: Pollard et Weihing, 1974; Weihing, 1976; Clarke et Spudich, 1977; Korn, 1978). Dans certaines cellules très motiles, telles que les amibes, l'actine représente de 20 à 30% des protéines totales cellulaires (Korn, 1978): l'actine y est donc la principale composante de l'appareil contractile (Isenberg et Wohlfarth-Bottermann, 1976; Kessler et collab., 1976) et l'élément essentiel du cytosquelette (Pollard, 1976; Kane, 1979; Owaribe et collab., 1979).

A- Propriétés physico-chimiques de l'actine

L'actine monomérique des cellules non musculaires possède le même poids moléculaire que la G-actine musculaire, soit environ 42 000 daltons. Il est également intéressant de remarquer qu'il y a très peu de variations dans la composition en acides aminés de l'actine de diverses cellules. Si on établit, par exemple, une comparaison entre la composition en acides aminés de l'actine musculaire et celle de l'actine d'une amibe, Acanthamoeba castellanii, seulement 6% des résidus diffèrent (Korn, 1978). On peut donc parler d'une évolution conservatrice de l'actine.

FIGURE 1 Représentation schématique de la G-actine et de la F-actine. La G-actine a la propriété de polymériser en F-actine sous certaines conditions, telles que 2mM MgCl_2 ou .1M KCl. La F-actine se dépolymérise en G-actine en présence de KI, .6M.

FIGURE 2 Clivage enzymatique de la myosine musculaire. La trypsine coupe cette molécule en deux fragments: l'HMM, méromyosine lourde, et la LMM, méromyosine légère. La papaïne subdivise l'HMM en deux sous-fragments: l'HMM- S_1 et l'HMM- S_2 . HC, chaînes lourdes; LC, paires de chaînes légères.



La polymérisation est une propriété importante de l'actine. Elle est essentielle à la fonction contractile de l'actine. Seule l'actine filamentueuse se lie à la myosine, stimule l'activité Mg^{2+} ATPasique de la myosine durant la conversion de l'énergie chimique de l'ATP en travail mécanique et peut transmettre la tension (Pollard, 1975). La polymérisation semble également être un prérequis dans la fonction cytosquelettique de l'actine: les changements structuraux du cytoplasme seraient essentiellement liés au cycle polymérisation - dépolymérisation de l'actine (Isenberg et Wohlfarth-Bottermann, 1976; Condeelis et Taylor, 1977).

Tout comme l'actine musculaire, les actines cytoplasmiques isolées et purifiées polymérisent sous certaines conditions (.1M KCl ou 2mM $MgCl_2$) pour former des filaments de 7nm de diamètre. La structure de ces filaments est celle d'une double hélice ayant un demi-pas de 35nm (Forer, 1978). Au cours de la polymérisation, une molécule d'ATP est convertie en ADP et cet ADP reste lié à chaque monomère d'actine. La polymérisation de l'actine comporte au moins deux étapes (Korn, 1978):

- 1- la nucléation, formation de petits oligomères d'actine qui agissent comme points de croissance;
- 2- l'élongation, addition de monomères à l'extrémité des oligomères pour former les filaments d'actine.

L'étape critique est sans nul doute la nucléation qui ne se produit qu'au-dessus d'une certaine concentration d'actine, appelée concentration critique. Si l'on compare les concentrations critiques de diverses actines cytoplasmiques et celle de l'actine musculaire, on note certaines différences quantitatives: dans les

mêmes conditions expérimentales, les concentrations critiques des actines cytoplasmiques isolées sont plus élevées. Il est important de souligner ici que ces différences ne peuvent toutefois expliquer les quantités importantes d'actine monomérique présentes dans diverses cellules non musculaires (Bray et Clive, 1976; Bray et Thomas, 1976, Mabuchi, 1979). Des études récentes ont démontré la présence, dans plusieurs de ces cellules, de facteurs cytoplasmiques qui inhibent la polymérisation de l'actine, stabilisent la forme monomérique ou encore déstabilisent la F-actine (voir sous-chapitre 3B). L'absence de facteurs stabilisants de la F-actine, tels que la troponine et la tropomyosine, peut également contribuer à maintenir un pool important d'actine monomérique dans certaines cellules non musculaires.

B- L'actine d'*Amoeba proteus*

Amoeba proteus se prête mal aux études biochimiques: sa croissance est lente et l'extraction de l'actine, qui fournit souvent de faibles rendements dans les cellules non musculaires, exige des quantités importantes de matériel biologique. A notre connaissance, on n'a pas encore caractérisé biochimiquement l'actine de cette amibe.

La microscopie électronique a toutefois permis de démontrer la présence d'actine dans le cytoplasme d'*Amoeba proteus*. Le marquage à l'HMM (méromyosine lourde) ou au S₁ (subfragment 1), deux fragments protéolytiques de la myosine musculaire (Figure 2), constitue en effet une technique spécifique pour identifier l'actine dans les cellules (Ishikawa et collab., 1969; Huxley, 1973). L'actine d'*Amoeba proteus* se décore ainsi de façon caractéristique dite en têtes de flèche (Pollard et Korn, 1971; Comly, 1973).

1.2 La myosine

A- Propriétés physico-chimiques de la myosine

I- Propriétés physico-chimiques de la myosine musculaire

La myosine du muscle strié est composée de deux chaînes polypeptidiques lourdes, d'environ 220 000 daltons, et de deux paires de chaînes légères, de 16 000 à 21 000 daltons, qui se combinent pour former la molécule d'un poids moléculaire d'environ 500 000 daltons (Lowey et collab., 1969; Sarkar, 1971; Stafford III et Szent-Györgyi, 1978). On peut observer cette grosse molécule en microscopie électronique: elle a l'aspect d'une longue queue surmontée de deux têtes (Slayter et Lowey, 1967).

Le clivage enzymatique de la molécule de myosine (Figure 2) par la trypsine et la papaïne la subdivise en trois fragments: la LMM (méromyosine légère) constituée des 2/3 de la queue de la molécule, l'HMM-S₁ (méromyosine lourde-S₁) ou portion globulaire de la méromyosine lourde et l'HMM-S₂ (méromyosine-S₂), partie "queue" de la méromyosine lourde. Le rôle de chacun de ces fragments a été déterminé:

- les unités globulaires S₁, d'environ 70 Å⁰ de diamètre, ont à la fois un site ATPasique et un site liant l'actine; elles sont solubles dans l'eau.
- l'HMM-S₂, d'environ 400 à 500 Å⁰ de longueur, constitue la partie hélicoïdale, structurale de l'HMM; elle est soluble à faible force ionique et ne précipite donc pas dans des conditions physiologiques.

- la LMM, deux polypeptides en hélice α , d'environ 900 Å de longueur, est insoluble à faible force ionique et précipite dans des conditions physiologiques; ce fragment est structuralement essentiel à l'agrégation des molécules de myosine en filaments épais.

II- Propriétés physico-chimiques des myosines non musculaires

La plupart des myosines non musculaires isolées sont constituées également de deux chaînes lourdes et de deux paires de chaînes légères (Korn, 1978; Clarke et Spudich, 1974). Les myosines IA et IB d'Acanthamoeba font toutefois exception à cette généralité: elles sont constituées d'une seule chaîne lourde (130 000 daltons pour IA et 125 000 daltons pour IB) et de deux chaînes légères (17 000 et 14 000 daltons pour IA, 27 000 et 14 000 daltons pour IB) (Pollard et collab., 1973; Maruta et Korn, 1977a; Maruta et Korn, 1977b; Korn et collab., 1979). La myosine II d'Acanthamoeba présente d'autre part une homologie structurale avec la myosine musculaire: son poids moléculaire est de 350 000 daltons et elle est composée de deux chaînes polypeptidiques lourdes (170 000 daltons) et de deux paires de chaînes légères (17 000 et 17 500 daltons). Malgré ces homologies structurales, on ne peut parler d'une évolution conservatrice de la myosine. La composition en acides aminés des myosines non musculaires diffère de celle de la myosine du muscle strié. Toutes les myosines ne catalysent pas l'hydrolyse d'ATP avec la même efficacité (Schwartz, 1978) et leurs propriétés de solubilité varient.

B- Activité ATPasique de la myosine

I- Activité ATPasique de la myosine du muscle strié

D'un point de vue biochimique, l'ATPase de la myosine est particulière: elle est fortement inhibée en présence de Mg^{2+} et est activée par le Ca^{2+} ou le K^+ en présence d'EDTA. Dans le muscle, où le Mg^{2+} est présent à des concentrations plus fortes que 8mM/kg, la stimulation de l'activité Mg^{2+} ATPasique de la myosine par l'actine est donc essentielle à la contraction puisque, sans cette stimulation, l'activité ATPasique de la myosine serait trop faible pour réaliser la transformation de l'énergie de l'ATP en force pour le mouvement. Il en ressort donc que l'interaction de la myosine avec la F-actine et l'activation de la Mg^{2+} ATPase de la myosine par la F-actine sont des caractéristiques essentielles qui permettent d'identifier les myosines non musculaires.

II- Activité ATPasique des myosines non musculaires

L'activité ATPasique des myosines cytoplasmiques isolées varie d'une myosine à l'autre (Korn, 1978), mais elle s'apparente généralement à l'activité de l'une ou l'autre des myosines provenant des différents types de muscle: squelettique, lisse ou cardiaque. Les myosines d'Acanthamoeba castellanii montrent toutefois des propriétés enzymatiques particulières. Les myosines I possèdent une activité K^+ , EDTA-ATPasique plus importante que leur activité Ca^{2+} -ATPasique et ont une très faible activité Mg^{2+} ATPasique: la F-actine ne stimule cette activité Mg^{2+} ATPasique qu'en présence d'une autre protéine cytoplasmique, le cofacteur (Maruta et Korn, 1977b; Korn et collab., 1979). Quant à la myosine II, elle possède une activité Ca^{2+} -ATPasique plus importante que son activité K^+ , EDTA-ATPasique et montre une forte activité Mg^{2+} -ATPasique stimulée par l'actine, sensible au Ca^{2+} , lorsque ses chaînes lourdes ne sont pas entièrement phosphorylées (Collins et Korn, 1980; Collins et Korn, 1981).

C- Agrégation des molécules de myosine: filaments épais

I- Filaments bipolaires de myosine dans le muscle strié

Dans le muscle strié, les molécules de myosine sont arrangées en filaments bipolaires dont la morphologie nous est familière. Ces filaments ont environ 18nm de diamètre, 1 500nm de longueur et sont formés de 300 à 400 molécules de myosine (Pepe, 1979). Ils montrent une zone centrale lisse d'environ 150nm et, à chaque extrémité, des projections globulaires arrangées hélicoïdalement. La zone centrale est constituée des queues (LMM) des molécules de myosine alors que les projections globulaires correspondent aux têtes (HMM) des molécules de myosine. Ces filaments sont dits bipolaires parce que la polarité des molécules de myosine est différente de part et d'autre de la zone centrale (Figure 3).

In vitro, les molécules de myosine musculaire purifiée s'agrègent à faible force ionique ($< .1M$ KCl), pour former des filaments bipolaires morphologiquement distincts de ceux observés in vivo: on n'y retrouve plus de zone centrale lisse mais on observe plutôt un arrangement régulier des têtes de myosine tout le long des filaments (D'Haese et Hinssen, 1979).

II- Filaments épais de myosine non musculaire

Bien que leurs propriétés de solubilité soient différentes de celles de la myosine du muscle strié, les myosines non musculaires isolées forment généralement des filaments épais in vitro (Nachmias, 1972; Mabuchi, 1973; D'Haese et Hinssen, 1979; Hatano et collab., 1980). Leur mode d'agrégation semble

toutefois s'apparenter davantage au mode d'agrégation de la myosine du muscle lisse qu'à celui de la myosine du muscle strié: les myosines non musculaires s'arrangent en filaments bipolaires de type asymétrique (Figure 3), caractérisés par un arrangement régulier des têtes de myosine tout le long des filaments et par des régions lisses aux extrémités (Craig et Megerman, 1979; D'Haese et Hinssen, 1979; Nachmias, 1979). Les myosines I d'Acanthamoeba ne forment pas de filaments épais. Pollard (1979) suggère que ces myosines I puissent être fonctionnelles à l'état monomoléculaire.

In vivo, on observe rarement des filaments épais dans les cellules non musculaires. On explique généralement l'absence de ces filaments sur les micrographies électroniques par les faibles concentrations de myosine dans les cellules non musculaires et, conséquemment, par la faible probabilité d'observer ces filaments dans une coupe fine (Niederman et Pollard, 1975).

D- Propriétés de la myosine d'*Amoeba proteus*

Comme nous l'avons déjà souligné, les études biochimiques sur *Amoeba proteus* sont techniquement difficiles à réaliser. Simard-Duquesne et Couillard (1962) ont toutefois isolé et purifié chez cette amibe une ATPase semblable à la myosine musculaire par ses propriétés enzymatiques. Condeelis (1977) a ultérieurement isolé des microquantités de myosine à partir de cette cellule: il a ainsi montré, par électrophorèse, que les chaînes lourdes de la myosine d'*Amoeba proteus* ont un poids moléculaire d'environ 225 000 et a également caractérisé l'activité ATPasique de cette myosine cytoplasmique.

La myosine d'*Amoeba proteus* forme in vitro des filaments épais dont la

morphologie se rapproche de celle des filaments de myosine du muscle lisse (D'Haese et Hinssen, 1979; Nonomura, 1979), c'est-à-dire de type asymétrique. Plusieurs recherches ont montré la présence de ces filaments épais in vivo (Pollard et Ito, 1970; Condeelis, 1977). Leur morphologie asymétrique n'est pas toujours évidente et l'on associe généralement leur morphologie in vivo à celle des filaments de myosine du muscle strié (filaments bipolaires).

1.3 Microtubules et filaments de taille intermédiaire

A- Microtubules

Les microtubules représentent une autre structure cytoplasmique importante dans les phénomènes motiles de différentes cellules. Ils se distinguent facilement des filaments d'actine par leur diamètre plus important (24nm) et leur morphologie en cylindre creux. Ce sont, de plus, des polymères d'une autre protéine, la tubuline (revues: Snyder et McIntosh, 1976; Weber, 1976). Les microtubules ne constituent pas une structure cytoplasmique permanente dans Amoeba proteus: on ne les observe que durant la mitose. Ils ne représentent donc pas une structure contractile essentielle au mouvement cytoplasmique dans cette cellule.

B- Filaments de taille intermédiaire

D'abord observés dans le muscle strié (Ishikawa et collab., 1968; Kelly, 1969), les filaments de taille intermédiaire doivent leur appellation à leur diamètre de 10nm, intermédiaire entre ceux de l'actine et de la myosine.

Dans les préparations colorées négativement, en microscopie électronique, les filaments de taille intermédiaire se distinguent des filaments d'actine par leur diamètre et leur ultrastructure (Franke et collab., 1978a): ils sont formés d'un nombre variable, d'une cellule à l'autre, de protofilaments (Ishikawa et collab., 1968; Schlaepfer, 1977a; Mori et Kurokawa, 1980). On les retrouve dans plusieurs cellules et ils ont donné naissance à une nouvelle terminologie. Ils sont ainsi classés sous différents termes: tonofilaments dans les cellules épithéliales et épidermiques (Brecher, 1975; Franke et collab., 1978b), neurofilaments dans les cellules nerveuses (Yen et collab., 1976; Schlaepfer, 1977a; Schlaepfer, 1977b; Schlaepfer et Freeman, 1978; Mori et Kurokawa, 1980), filaments gliaux dans les cellules neurogliales (Wuerker, 1970), etc. On les désigne encore par leur appellation générale dans d'autres cellules: cellules des muscles lisse, cardiaque et strié (Campbell et collab., 1979), cellules mésenchymales, etc...

De nombreuses études ont permis d'isoler les protéines constitutantes de ces filaments de taille intermédiaire telles que: la squelettine, appelée également desmine, pour les filaments des muscles lisse, cardiaque et strié (Lazarides et Hubbard, 1976; Small et Sobieszek, 1977; Hubbard et Lazarides, 1979; Lazarides et collab., 1979; Lazarides, 1980), la protéine acide fibrillaire (GFA) pour les filaments gliaux (Dahl et Bignami, 1976), la kératine ou prékératine pour les tonofilaments (Brysk et collab., 1977), la vimentine pour les filaments des cellules mésenchymales (Franke et collab., 1978a; Franke et collab., 1978b; Lazarides, 1980), les NFP ("neurofilaments proteins") pour les neurofilaments (Lasek et collab., 1979).

Il semble ainsi y avoir plusieurs types biochimiquement et immunologiquement distincts de filaments intermédiaires (Liem et collab., 1978; Bennett

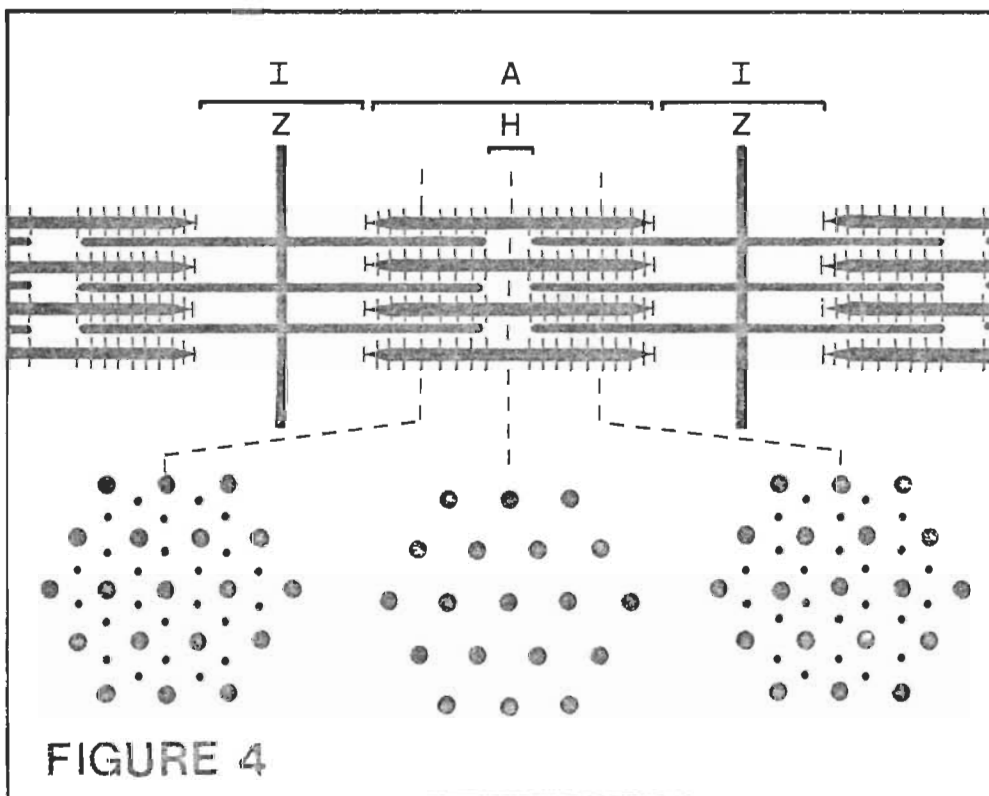
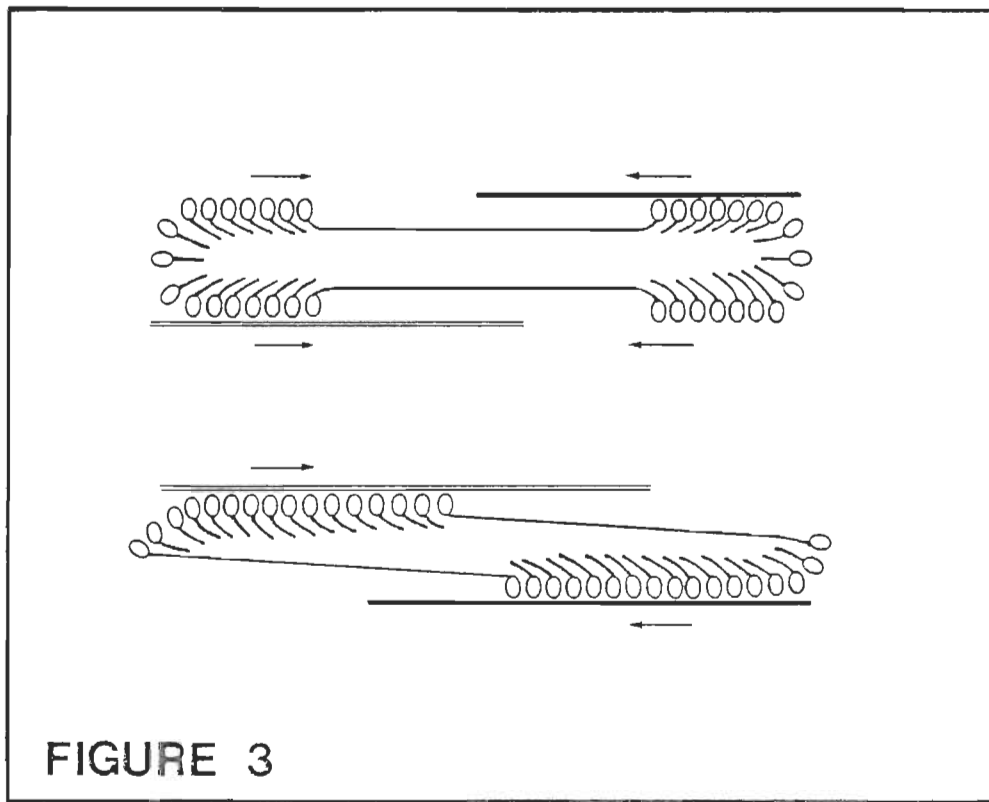
et collab., 1979). Certains auteurs suggèrent toutefois que ces filaments de différentes sources puissent être essentiellement constitués d'une même protéine (Bloise et collab., 1977; Small et Sobieszek, 1977; Starger et collab., 1978). Dans ce sens, Buckley et collab. (1978, 1979) avaient suggéré que, dans des cellules de tissu conjonctif d'embryon de poulet, les filaments intermédiaires puissent, après traitement à la trypsine, être décorés à l'HMM et qu'ainsi l'actine soit la principale composante de ce type de filaments. Récemment, cependant, ces mêmes auteurs (Buckley et collab., 1981) ont montré que la trypsination élimine les filaments intermédiaires dans ces cellules et ont donc mis en doute leurs résultats antérieurs.

Le rôle cytoplasmique des filaments de taille intermédiaire est encore mal défini. On s'entend généralement pour leur attribuer une fonction cytosquelettique (Cooke, 1976).

A notre connaissance, ce type de filaments n'avait jamais été observé dans le cytoplasme d'amibes avant le présent travail.

FIGURE 3 Représentation schématique montrant les caractéristiques structurales des filaments de myosine du muscle strié (en haut) et du muscle lisse (en bas). Les filaments de myosine du muscle strié sont bipolaires: la polarité des molécules de myosine est inversée de part et d'autre d'une zone centrale lisse. Ils sont de plus symétriques. Les filaments de myosine du muscle lisse sont de type asymétrique : ils sont bipolaires; la polarité des molécules est inversée de part et d'autre du filament; il n'y a pas de zone centrale lisse mais des régions lisses aux extrémités.

FIGURE 4 Représentation schématique d'un sarcomère en coupe longitudinale (en haut) et en coupes transversales (en bas). Les filaments d'actine constituent, avec la troponine et la tropomyosine, les filaments fins attachés à la membrane Z selon une polarité spécifique. Les filaments épais représentent ici les filaments de myosine bipolaires.



2. Organisation des protéines contractiles

Dans le muscle strié, les protéines contractiles sont arrangées dans une structure hautement spécialisée: le sarcomère (Figure 4). Des études sur l'ultrastructure (microscopie électronique et diffraction des rayons X), sur la physiologie et la biochimie du muscle appuient l'élégante hypothèse de Huxley (1969). Celui-ci propose que la force contractile soit générée par un glissement des filaments d'actine le long des filaments de myosine. Le mouvement de glissement se ferait par une interaction cyclique des têtes de myosine avec les filaments d'actine. Ce mécanisme implique que les molécules de myosine et d'actine soient assemblées en filaments selon une polarité structurale appropriée (Huxley, 1973).

Dans les cellules non musculaires, la mise en évidence de l'organisation des protéines contractiles pose de sérieux problèmes. Ainsi les amibes réagissent mal aux techniques de routine utilisées lors de la préparation des spécimens pour la microscopie électronique. Elles subissent de tels changements morphologiques qu'en général les micrographies électroniques ne fournissent pas d'informations certaines sur l'arrangement intracellulaire de leur "machinerie" contractile. Les filaments d'actine non musculaire ne sont pas préservés par les techniques conventionnelles de fixation et de coloration utilisées en microscopie électronique. Ils sont en effet détruits sous l'action des fixateurs (Pollard et Ito, 1970; Pollard, 1976; Maupin-Szamier et Pollard, 1978; Taniguchi et Ishikawa, 1978; Ishikawa, 1979; Lehrer, 1981). On ne s'était pas rendu compte de ce problème technique lors de l'étude du muscle strié puisque, nous le savons maintenant, la troponine et la tropomyosine, qui constituent avec l'actine les filaments fins, y protègent et stabilisent l'actine contre l'action des

fixateurs. Or, ces protéines ne sont généralement pas présentes dans les cellules non musculaires et l'actine y est conséquemment moins stable (Schroeder, 1973; De Rosier et collab., 1977).

Quelles sont les structures que forment l'actine et la myosine dans les cellules non musculaires et comment ces structures interagissent-elles pour provoquer le mouvement? Ce sont les deux questions fondamentales de notre recherche. On peut présumer, comme l'ont proposé Hatano et Oosawa (1979), que l'organisation de ces protéines implique au moins deux processus:

- 1- la polymérisation des molécules en polymères;
- 2- l'assemblage des polymères en structures plus complexes, c'est-à-dire en structures subcellulaires.

2.1 Organisation de l'actine dans le muscle strié et dans les cellules non musculaires

Dans le muscle strié, l'actine est sous forme de filaments et constitue, avec la troponine et la tropomyosine, les filaments fins du sarcomère (Figure 4). Ces filaments n'interagissent pas entre eux et sont attachés aux lignes Z selon une polarité spécifique.

Par contre, dans les cellules non musculaires, l'actine serait à la fois sous forme de monomères et sous forme de filaments. Certaines observations démontrent que, dans ces cellules, les filaments d'actine interagissent entre eux pour former des structures plus complexes telles que des réseaux

tridimensionnels d'actine (gels) ou des agrégats parallèles de filaments (faisceaux). Il est important de souligner que ces structures ne sont pas stables mais qu'elles constituent des arrangements "transitoires" qui correspondent à différents états motiles de la cellule (Kamiya, 1973; Nagai et collab., 1975; Brown et collab., 1976; Matsumura et Hatano, 1978). Il est donc essentiel de décrire brièvement les caractéristiques de ces deux modes d'organisation des filaments d'actine non musculaire.

A- Réseaux d'actine

Plusieurs recherches ont souligné la présence de réseaux d'actine dans les cellules non musculaires (Buckley et Raju, 1976; Kamiya, 1979). On en a étudié l'ultrastructure in vitro. Ces études, menées à la fois sur de l'actine non musculaire purifiée et sur des extraits cytoplasmiques, montrent que l'actine, seule ou en présence de certaines protéines accessoires, peut s'arranger en réseaux tridimensionnels pour former un gel (Pollard et Ito, 1970; Pollard, 1976). L'actine musculaire, pure ou en présence d'autres protéines, a également la propriété de gélifier (Maruyama et collab., 1974). On ne s'explique pas toutefois le rôle d'un processus de gélification dans le muscle puisqu'on n'observe pas cet arrangement in vivo. Dans les cellules non musculaires, les observations in vivo suggèrent que la gélification puisse être un processus important de la motilité cellulaire:

- a) le gel pourrait être responsable de la forme cellulaire ou encore de la consistance du cytoplasme;
- b) le gel pourrait servir de trame contractile en transmettant la tension

générée par des contractions locales, comme c'est le cas chez Dictyostelium (Buckley et Porter, 1967; Eckert et collab., 1977);

- c) le gel pourrait empêcher la contraction en maintenant l'actine sous une forme incapable d'interagir avec la myosine (Condeelis et Taylor, 1977; Hellewell et Taylor, 1979).

B- Faisceaux d'actine

On a souvent observé des faisceaux (appelés parfois "stress fibers") de filaments d'actine dans différentes cellules non musculaires (Alléra et collab., 1971; Morgan, 1971; Perry et collab., 1971; Schroeder, 1973; Lazarides et Weber, 1974; Spudich, 1974; Spudich et Cooke, 1975; Schloss et collab., 1977; Kamiya, 1979; Weber et Osborn, 1979; Williamson et Toh, 1979). On distingue essentiellement deux types de faisceaux: des faisceaux unipolaires et des faisceaux bipolaires. Les faisceaux unipolaires correspondent à un arrangement parallèle compact selon une seule polarité (Kersey et Wessels, 1976; Kane, 1976; Matsumura et Hatano, 1978; Hatano et collab., 1979; Nagai et Hayama, 1979a; Nagai et Hayama, 1979b; Hatano et collab., 1980). C'est le cas des paracristaux d'actine décrits par Tilney (1975). Il semble que ce type de faisceaux ait une fonction cytosquelettique (Kane, 1975; Burgess et Schroeder, 1977; De Rosier et collab., 1977; Bryan et Kane, 1978; Edds, 1979) et que certaines protéines accessoires soient impliquées dans leur formation.

Dans les faisceaux bipolaires, généralement plus lâches que les faisceaux unipolaires, les filaments d'actine sont également arrangés de façon parallèle. On y distingue toutefois deux polarités. On retrouve parfois

des myosines à l'intérieur de ce type de faisceaux (Nachmias, 1973; Pollard et Weihing, 1974; Clarke et collab., 1975; Burnside, 1978; Ishikawa, 1979). On leur attribue une fonction essentiellement contractile et ils pourraient représenter une forme cellulaire d'actomyosine.

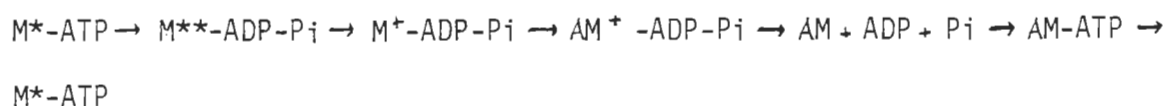
C- Organisation de l'actine dans *Amoeba proteus*

On sait très peu de choses sur l'organisation de l'actine dans *Amoeba proteus*. Cela est dû essentiellement aux problèmes techniques liés à la préparation du matériel pour la microscopie électronique. Pollard et Ito (1970) ont toutefois observé la formation de "fibrilles" dans des extraits cytoplasmiques d'*Amoeba proteus*. Récemment, Hauser (1978) a observé des réseaux et des faisceaux de filaments d'actine dans le cytoplasme d'*Amoeba proteus*: réseaux tridimensionnels à proximité de la membrane et faisceaux à l'interface ectoplasme-endoplasme. La résolution limitée des coupes fines n'a pu permettre dans ce cas d'établir la nature des interactions entre filaments d'actine.

2.2 L'actomyosine

A- Actomyosine musculaire

L'actomyosine, c'est-à-dire l'association de l'actine et de la myosine, est le complexe fonctionnel de la contraction musculaire. C'est ce complexe qui convertit l'énergie chimique de l'ATP en travail mécanique. On peut résumer le cycle de l'actomyosine ainsi:



où M, M*, M**, M⁺ sont différents états conformationnels de la myosine.

On note que le complexe actomyosine se dissocie en présence d'ATP. En absence d'ATP, les têtes de la myosine restent attachées à l'actine et le muscle est alors à l'état de rigor. La dissociation de l'actomyosine par l'ATP est beaucoup plus rapide que sa réassociation en absence de ce nucléotide.

B- Actomyosine non musculaire

Il est fort probable que l'actomyosine soit également le complexe fonctionnel de la contractilité non musculaire. Comme nous l'avons déjà souligné, dans le cas d'Acanthamoeba, certains complexes actomyosines non musculaires nécessitent toutefois la présence d'une protéine, le cofacteur, de façon à ce que l'actine stimule efficacement l'activité Mg^{2+} ATPasique de la myosine (Pollard, 1975; Stossel et Hartwig, 1976). Chez Acanthamoeba castellanii, on a caractérisé ce cofacteur comme étant une kinase qui catalyse spécifiquement la phosphorylation de la chaîne lourde des myosines I (Maruta et Korn, 1977b).

Il nous faut également souligner que, contrairement à l'organisation musculaire, il est peu probable que la myosine soit toujours fonctionnelle sous forme de filaments épais dans les complexes actomyosines cytoplasmiques (Matsushima et Hatano, 1978; Hatano et Oosawa, 1979). Il semble que la forme monomoléculaire y soit également active (Yano et Shimizu, 1978; Yano et collab., 1978; Tirosh et collab., 1979).

C- Actomyosine d'*Amoeba proteus*

Comme nous l'avons dit, la myosine d'Amoeba proteus est l'une des rares, avec la myosine du muscle strié, à former des filaments stables dans les conditions intracellulaires (Pollard et Ito, 1970). Il est probable que ces filaments représentent une forme fonctionnelle de la myosine dans cette cellule. En se fondant sur la stabilité cytoplasmique de ces filaments, Taylor et collab. (1979) ont proposé que le complexe actomyosine puisse jouer, en plus de ses fonctions contractiles, un rôle cytosquelettique dans Amoeba proteus: les changements de consistance cytoplasmique seraient couplés au cycle association - dissociation de filaments d'actine et de myosine stables.

2.3 Organisation des filaments intermédiaires

L'organisation intracellulaire des filaments intermédiaires a été peu étudiée. Ils apparaissent dans diverses cellules comme des filaments individuels sans ramifications (Mori et Kurokawa, 1980) tandis que dans d'autres cellules, ils forment des réseaux de filaments ramifiés et interconnectés (Cooke, 1976; Franke et collab., 1978a; Franke et collab., 1978b).

3. Régulation de la contractilité

La régulation de la contractilité constitue l'objet de nombreuses études et représente actuellement l'un des domaines les plus intéressants de la recherche sur la motilité cellulaire.

A- Mécanismes régulateurs dans les cellules musculaires

Dans le muscle strié, l'interaction de l'actine et de la myosine est modulée par la concentration d'ions Ca^{2+} dans le sarcoplasme (revue: Ebashi, 1972).

Quand le muscle est au repos, la concentration des ions Ca^{2+} dans le sarcoplasme est faible: l'interaction actine-myosine est alors empêchée par le complexe troponine-tropomyosine. La tropomyosine est une protéine fibreuse que l'on retrouve dans le sillon de la torsade à deux brins de la F-actine et qui, à faibles concentrations de Ca^{2+} , recouvre le site actif "liant la myosine" de sept monomères d'actine. La troponine est une protéine globulaire qui a une grande affinité pour les ions Ca^{2+} ; elle s'attache au filament d'actine par deux sites de fixation, l'un spécifique pour le brin d'actine et l'autre spécifique à la tropomyosine.

Lors de la contraction, les ions Ca^{2+} sont relargués dans le sarcoplasme. Ces ions se lient à la troponine. Il se produit alors un changement conformationnel de la tropomyosine: le site actif de l'actine est libéré. L'interaction actine-myosine est possible.

Ce mode de régulation liée à l'actine a été mis en évidence dans le muscle strié des vertébrés (Ebashi et Ebashi, 1964; Ebashi et Kodama, 1965; Lehman et collab., 1973; Potter et Gergely, 1974; Gergely, 1976). La découverte d'un système régulateur lié à la myosine dans le muscle strié d'invertébrés par Kendrick-Jones et collab. (1970) a montré qu'il pouvait exister une diversité des mécanismes régulateurs dans le règne animal. Ainsi dans les muscles de mollusques, ce sont les sites actifs de la myosine qui sont bloqués par une sous-unité de la myosine, la chaîne légère régulatrice. Pires et collab. (1974) ont ultérieurement montré que la phosphorylation des chaînes légères de la myosine modifiait son activité ATPasique et que la kinase responsable de cette phosphorylation était sensible au Ca^{2+} .

B- Mécanismes régulateurs dans les cellules non musculaires

I- Rôle probable des ions Ca^{2+} dans les mécanismes régulateurs

Dans les cellules non musculaires, il semble que le Ca^{2+} exerce également un rôle modulateur (Hitchcock, 1977; Dedman et collab., 1979; Kretsinger, 1979). Taylor et collab. (1973, 1976) ont ainsi, les premiers, suggéré le contrôle spécifique du Ca^{2+} sur la gélification et la contraction d'extraits cytoplasmiques d'amibes. De nombreuses autres recherches sur différentes cellules ont montré ultérieurement des résultats similaires (Hartwig et Stossel, 1975; Kane, 1975; Condeelis et Taylor, 1977; Maruta et Korn, 1977a; Taylor et collab., 1977; Tilney et collab., 1978; Hellewell et Taylor, 1979). Taylor (1977) a donc suggéré une dynamique de la contractilité dans l'amibe basée sur cette régulation spécifique du Ca^{2+} , soit un processus comportant deux étapes:

- 1- formation d'un cytosquelette (gélification) sans contraction à pH 7.0, à de faibles concentrations de Ca^{2+} ($<10^{-6}\text{M}$);
- 2- solification et contraction accompagnée du mouvement quand on élève la concentration du Ca^{2+} à 10^{-6}M en maintenant le pH à 7.0.

Les mécanismes de cette régulation par le Ca^{2+} sont néanmoins bien peu compris. Il faut souligner ici les difficultés de déterminer la concentration intracellulaire des ions Ca^{2+} , l'incertitude quant à la nature du système séquestreur-relargueur de Ca^{2+} —— vésicules (Kato, 1979), mitochondries (Lehninger et Carafoli, 1967), membranes (Reinhold et Stockem, 1972; Hitchcock, 1977)?—— nécessaire à la fonction régulatrice de ces ions.

Il apparaît de plus en plus plausible, d'autre part, que la régulation de la contractilité non musculaire, qui est un phénomène complexe, puisse impliquer plus d'un mécanisme (Szent-Györgyi, 1975; Hitchcock, 1977; Hellewell et Taylor, 1979):

- 1- certaines recherches ont montré que, dans les cellules non musculaires, la régulation peut être liée à l'actine (Fine et Blitz, 1976; Hitchcock, 1977); des protéines semblables à la tropomyosine ont été isolées et caractérisées dans quelques cellules telles que les plaquettes et les fibroblastes, mais on n'y a toutefois pas retrouvé de complexes troponine.
- 2- quelques études suggèrent que la phosphorylation des chaînes légères de la myosine puisse être un mécanisme régulateur non musculaire (Görecka et collab., 1976).

- 3- Korn et collab. (1979) et Collins et Korn (1980, 1981) ont démontré que la phosphorylation et déphosphorylation des chaînes lourdes des myosines d'Acanthamoeba castellanii constituaient des mécanismes de régulation dans cette amibe: phosphorylation de la chaîne lourde par une kinase, le cofacteur, dans le cas des myosines I et déphosphorylation des chaînes lourdes dans le cas de la myosine II.
- 4- une autre façon de moduler la contractilité liée au complexe actomyosine dans les cellules non musculaires pourrait être de contrôler la polymérisation de l'actine et son organisation en structures plus complexes telles que nous les avons précédemment décrites.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à la régulation de la contractilité non musculaire via la polymérisation et l'organisation de l'actine dans le présent travail.

Précédemment, Götz von Olenhusen et Wolfarth-Bottermann (1979) avaient montré que les transformations G-actine \rightleftharpoons F-actine sont essentielles au cycle contraction-relaxation de l'actomyosine cytoplasmique de Physarum. Hellewell et Taylor (1979) et Kamiya (1979) avaient également suggéré que ce cycle soit couplé à des transformations dans l'arrangement des polymères d'actine, tels que:

- Sol (F-actine libre) \rightleftharpoons gel (F-actine en réseaux) dans Dictyostelium.
- Faisceaux (arrangement parallèle des filaments) \rightleftharpoons gel (filaments en réseaux) dans Physarum.

Récemment, de nombreuses recherches ont mis en évidence des facteurs protéiques, appelés protéines accessoires de l'actine, pouvant influencer l'état de polymérisation de l'actine dans les cellules non musculaires. Hasegawa et collab. (1980), Yin et Stossel (1979), Yin et collab. (1980), Glenney et Weber (1981) ont montré le rôle modulateur du Ca^{2+} sur la fonction de certaines de ces protéines. On les considère comme des constituants probables des mécanismes régulateurs de la contractilité non musculaire. La littérature compte maintenant près d'une trentaine de protéines accessoires. Il n'est pas utile de donner ici une description exhaustive de toutes ces protéines. Nous soulignerons toutefois le mode d'action de quelques-unes d'entre elles sur l'actine. Le lecteur intéressé trouvera ici les références clefs qui l'amèneront à une étude plus approfondie de l'une ou l'autre de ces protéines.

On peut grossièrement subdiviser les protéines accessoires de l'actine en deux groupes:

- 1- protéines qui interagissent avec l'actine monomérique;
 - 2- protéines qui interagissent avec les filaments d'actine.
- 1- Parmi les protéines qui interagissent avec la G-actine, nous retiendrons: la profiline (Carlsson et collab., 1976; Carlsson et collab., 1977; Harris et Weeds, 1978; Reichstein et Korn, 1979), la DNAase I (Lazarides et Lindberg, 1977) et la spectrine (Tilney et collab., 1973; Tilney, 1974; Tilney, 1976a; Tilney, 1976b; Stossel et Hartwig, 1976) qui en préviennent la polymérisation; la villine (Glenney et Weber, 1981) qui, en présence d'ions Ca^{2+} , en modifie la polymérisation.

2- De nombreuses protéines interagissent avec la F-actine. Les "actin-binding" protéines (Hartwig et Stossel, 1975; Kane, 1976; De Rosier et collab., 1977, Brotschi et collab., 1978; Bryan et Kane, 1978; Stossel et collab., 1979), la filamine (Wang et collab., 1975; Davies et collab., 1977; Maruta et Korn, 1977a; Brotschi et collab., 1978), la spectrine (Brenner et Korn, 1979; Ungewickell et collab., 1979; Calvert et collab., 1980; Cohen et Foley, 1980; Fowler et collab., 1981), l' α -actinine (Lazarides et Burridge, 1975; Jockusch et Isenberg, 1981) et les gelactines (Korn, 1978) sont des facteurs gélifiants, c'est-à-dire que ces protéines, en liant les filaments d'actine entre eux, favorisent l'arrangement de ces filaments en réseaux tridimensionnels.

D'autres protéines semblent être impliquées dans les arrangements parallèles des filaments d'actine: la fascine (Otto et collab., 1979); la vinculine qui inhibe également la gélification (Jockusch et Isenberg, 1981) et lie les filaments à la membrane plasmique (Geiger et collab., 1979); la villine qui induit l'arrangement en faisceaux en absence d'ions Ca^{2+} et fragmente la F-actine en présence de Ca^{2+} (Bretscher et Weber, 1980; Glenney et collab., 1981).

Des protéines enfin influencent l'équilibre $\text{G-actine} \rightleftharpoons \text{F-actine}$: la gelsoline (Yin et Stossel, 1979; Yin et collab., 1980) et la fragmine (Hasegawa et collab., 1980) inhibent la gélification de la F-actine en la coupant en courts filaments; la DNAase I (Hitchcock et collab., 1975; Manherz et collab., 1975; Hitchcock et collab., 1976; Raju et collab., 1978) induit la dépolymérisation des filaments.

II- Autres facteurs pouvant influencer la contractilité non musculaire

Nous avons beaucoup insisté sur le rôle probable des ions Ca^{2+} dans la régulation de la contractilité non musculaire. C'est sans doute parce que ce facteur, par analogie avec la contractilité musculaire, a fait l'objet de très nombreuses recherches. D'autres facteurs peuvent toutefois influencer la contractilité non musculaire. Les plus importants sont sûrement la concentration d'ATP (Kane, 1975; Sheetz et collab., 1976; Taylor et collab., 1977; Matsumura et Hatano, 1978) et le pH (Braatz-Schade et Stockem, 1973; Moore et collab., 1973; Taylor et collab., 1977; Tilney et collab., 1978; Begg et Rebhun, 1979; Spudich et collab., 1979). Nous avons précédemment souligné l'influence de l'ATP sur le complexe actomyosine. Si l'on suppose des variations locales dans la concentration d'ATP à l'intérieur d'une cellule, ce nucléotide peut être considéré comme un facteur régulateur de la contractilité. Le pH, d'autre part, comme l'ont souligné Condeelis et Taylor (1977) et Hellewell et Taylor (1979), influence la gélification et la contraction d'extraits cytoplasmiques d'amibes. On ne connaît pas les mécanismes de cette influence: régulation directe, régulation via effet du pH sur la concentration d'ions Ca^{2+} , régulation via effet du pH sur concentration d'ATP? Quelques recherches suggèrent que le pH puisse contrôler directement certains processus motiles. Ce serait le cas durant l'extension du processus acrosomal dans le spermatozoïde d'échinoderme où une augmentation du pH induit la polymérisation de l'actine (Tilney et collab., 1978). Begg et Rebhun (1979) ont également montré qu'une augmentation de pH provoque la polymérisation de l'actine dans le cortex d'oeufs d'oursin de mer non fécondés.

4. Objectif et plan de notre recherche

L'objectif essentiel de notre recherche a été de mettre en évidence l'organisation des protéines contractiles dans le cytoplasme d'Amoeba proteus.

Notre travail se subdivise en deux parties:

- 1- l'étude de l'influence de toxines, la phalloïdine et la viroïdine, sur le cytoplasme démembrané d'Amoeba proteus;
- 2- l'étude de l'influence du pH et de l'ATP sur les structures contractiles de cette amibe.

Et nous expliquerons ici ces deux démarches.

4.1 Influence de la phalloïdine et de la viroïdine sur le cytoplasme démembrané d'Amoeba proteus

. Pourquoi la phalloïdine et la viroïdine?

La phalloïdine est un heptapeptide bicyclique extrait de certaines espèces d'*Amanites* (Wieland et Faulstich, 1978). *In vitro*, ce peptide a la propriété remarquable de se lier spécifiquement à la F-actine et de rendre cette protéine plus résistante à un grand nombre d'agents physiques ou chimiques. La phalloïdine, *in vitro*, protège ainsi la F-actine contre l'action des ultra-sons (Dancker et collab., 1976), contre la dénaturation thermique (De Vries et collab., 1976), contre la dépolymérisation par les ions chaotropiques (Dancker et collab., 1975), la cytochalasine B (Low et Wieland, 1974)

et la DNAase I (Schafer et collab., 1975), contre l'action des protéases (De Vries et Wieland, 1978; Pollender et Gruda, 1979) et l'attaque oxydante de l'acide osmique ou du permanganate (Gicquaud et collab., 1980). De plus, la phalloïdine accélère in vitro la polymérisation de l'actine (Dancker et collab., 1975).

Or, comme nous l'avons souligné précédemment, la mise en évidence de l'organisation des protéines contractiles non musculaires, et plus particulièrement de l'actine cytoplasmique, pose de sérieux problèmes techniques en microscopie électronique. Rappelons que les fixateurs détruisent les filaments d'actine. La phalloïdine, en stabilisant les filaments d'actine, pourrait donc être un outil de recherche important dans l'étude de la motilité cellulaire, celle des amibes en particulier.

La viroïdine est un autre peptide toxique extrait d'Amanita virosa. Bien que sa structure soit monocyclique, il semble que ce peptide se comporte tout-à-fait comme la phalloïdine: son activité biologique et son affinité pour l'actine sont très semblables à celles de la phalloïdine (Faulstich et collab., 1980). Nous avons également étudié l'action de cette toxine sur le cytoplasme démembré d'Amoeba proteus.

.. Pourquoi le cytoplasme démembré d'Amoeba proteus?

L'action de la phalloïdine in vivo a été peu étudiée à cause de l'imperméabilité des membranes cellulaires à ce peptide. Seuls les hépatocytes y sont perméables. Dans ces cellules, la phalloïdine provoque une polymérisation irréversible de l'actine, ce qui entraîne une altération des fonctions hépatiques sous la dépendance de l'actine: maintien du cytosquelette, vacuo-

lisation des membranes, sécrétion biliaire (Agostini et collab., 1975a; Agostini et collab., 1975b; Gabbiani et collab., 1975; Tuchweber et Gabbiani, 1975). Dans d'autres cellules que l'hépatocyte, la phalloïdine polymérise également l'actine cytoplasmique à condition d'être microinjectée (Wehland et collab., 1977; Stockem et collab., 1978; Wehland et collab., 1978; Götz von Olenhusen et Wolfarth-Bottermann, 1979).

C'est à cause de ce problème d'imperméabilité membranaire que nous avons choisi d'étudier l'influence de la phalloïdine sur le cytoplasme démembré d'Amoeba proteus. Dans ce modèle cellulaire, d'abord mis au point par Gicquaud et Couillard (1970), le cytoplasme est directement en contact avec le milieu extérieur et il est alors possible d'observer les effets de la toxine sur le cytoplasme de cette amibe.

4.2 Influence du pH et de l'ATP sur les structures contractiles d'Amoeba proteus

Comme nous l'avons souligné, les mécanismes contrôlant la contractilité non musculaire demeurent peu compris. Taylor et collab. (1973, 1976) ont suggéré le rôle modulateur du Ca^{2+} sur la gélification et la contraction d'extraits cytoplasmiques d'amibes mais Cobbold (1980) a récemment opposé de sérieux arguments à la possibilité d'un tel contrôle in vivo sans toutefois en écarter l'hypothèse. Il nous a semblé plausible que la régulation de la contractilité dans Amoeba proteus puisse impliquer d'autres facteurs. Nous avons étudié l'influence d'une variation de pH et d'une variation dans la concentration d'ATP sur l'organisation des protéines contractiles dans cette cellule puisque ce sont deux facteurs qui s'étaient montrés importants dans le contrôle de processus motiles d'autres cellules.

5. Matériel et méthodes

5.1 Cultures d'amibes

Amoeba proteus est cultivée selon la méthode de Prescott et Carrier (1964). Ces cultures proviennent d'un clone établi en 1960 à partir d'une souche obtenue de General Biological Supply House de Chicago (Turtox). Nous avons substitué, au milieu de culture de Prescott et Carrier (1964), celui de Chalkley dont la composition est la suivante:

Na Cl 80mg/l, Na H CO₃ 4mg/l, KCl 2mg/l, CaH PO₄ 1mg/l, Na₂H PO₄. 12 H₂O 1mg/l.

Les amibes sont nourries avec un petit cilié, Tetrahymena pyriformis, deux à trois fois par semaine. Les Tetrahymena sont cultivés dans une solution aseptique de protéose-peptone 2%.

Les cultures d'amibes sont maintenues à la température de la pièce et à l'obscurité afin d'empêcher le développement d'algues photosynthétiques.

Les amibes sont soumises à un jeûne de 48 heures avant chaque expérience afin de diminuer le nombre de vacuoles digestives.

5.2 Phalloïdine

La phalloïdine est extraite d'Amanita virosa, récoltée dans le parc de la Mauricie (P.Q.), selon la méthode de Yocum et Simmons (1977) et purifiée par chromatographie sur colonne de Séphadex LH 20.

5.3 Viroïdine

La viroïdine est également extraite d'Amanita virosa selon la méthode de Yocum et Simmons (1977) et purifiée par HPLC par Gendreau et collab. (1981).

5.4 Technique de préparation du cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus*: préparations standard

Les préparations de cytoplasme démembré sont réalisées suivant la technique de Gicquaud et Couillard (1970). Une centaine de cellules sont placées entre lame et lamelle dans le milieu suivant: ATP 1mM, Tris 25mM, EGTA 0,75mM, $MgCl_2$ 2mM, KCl 20mM, NaCl 2,3mM, pH 7.2.

En aspirant doucement le liquide avec un papier filtre, on comprime les cellules jusqu'à ce que la membrane se rompe. Le cytoplasme s'écoule à l'extérieur et ne se disperse pas dans le milieu. Il s'y produit un ensemble de mouvements suivi d'une contraction du cytoplasme en une masse dense. On peut suivre ce processus en microscopie optique. Après 1 à 2 minutes, on retire la lamelle. Une goutte de cytoplasme est transférée sur une grille de microscopie électronique recouverte de formvar-carbone et rendue hydrophile par traitement au plasmaglow durant 15 à 30 secondes. On colore négativement cette préparation avec l'acétate d'uranium 1% et on l'observe en microscopie électronique.

5.5 Préparations exposées à la phalloïdine ou à la viroïdine

Les préparations de cytoplasme démembré exposé à la phalloïdine ou

à la viroïsine sont réalisées dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970) auquel on a ajouté l'une ou l'autre toxine à différentes concentrations. Les concentrations de phalloïdine utilisées étaient de $2 \times 10^{-6} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$, 10^{-5}M et $2 \times 10^{-5} \text{M}$. Nous avons étudié l'influence de $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de viroïsine. La technique de préparation est la même que celle décrite ci-haut.

5.6 Effet d'une variation de pH sur le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus*

Nous avons ajusté le milieu de Gicquaud et Couillard (1970) à différents pH, sur une échelle allant de 5.0 à 9.0, et avons réalisé nos préparations dans ces solutions suivant la même technique de préparation.

5.7 Effets conjugués du pH et de l'ATP sur le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus*

Nous avons utilisé le 2,4-dinitrophénol, agent découplant de la phosphorylation oxydative, afin de réduire la concentration d'ATP endogène des amibes qui devaient servir dans les préparations de cytoplasme réalisées en absence d'ATP. Les cellules sont préincubées dans une solution 10^{-4}M de 2,4-dinitrophénol durant 3 à 4 heures. Il est alors impossible de rompre la membrane de ces cellules en les comprimant entre lame et lamelle. Nous avons utilisé ici un homogénéisateur Potter-Elvehjem pour démembrer le cytoplasme.

Nous avons ainsi réalisé:

- 1- des préparations sans ATP: les cellules sont préincubées dans le DNP 3 à 4 heures, elles sont lavées et démembrées dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970) dépourvu d'ATP, ajusté au pH étudié;

- 2- des préparations sans ATP exogène: les cellules sont démembranées dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970), dépourvu d'ATP et ajusté au pH étudié, sans prétraitement au DNP.
- 3- des préparations avec ATP: les cellules sont démembranées dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970) ajusté au pH étudié.
- 4- des préparations "DNP + ATP": les cellules sont préincubées dans le DNP 3 à 4 heures. Elles sont lavées et démembranées dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970) ajusté au pH étudié.

Nous avons également repris ces quatre types de préparations en ajoutant $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de phalloïdine au milieu de Gicquaud et Couillard (1970).

5.8 Décoration de l'actine par l'HMM

Nous avons décoré à l'HMM l'actine du cytoplasme démembrané d'amibes préparé dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970):

- 1- dépourvu d'ATP (Tris 25mM, EGTA 0,75mM, MgCl_2 2mM, KCl 20mM, NaCl 2,3mM, pH 7.2);
- 2- dépourvu d'ATP et auquel on a ajouté $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de phalloïdine;
- 3- dépourvu d'ATP et auquel on a ajouté $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de viroïdine.

La technique de préparation du cytoplasme démembrané est toujours la

même. Le cytoplasme est déposé sur une grille de microscopie. On y ajoute une goutte de solution .5mg/ml d'HMM. On laisse réagir 30 secondes et on colore négativement.

La myosine a été préparée, à partir du muscle squelettique de lapin, d'après une modification de la méthode de Perry (1955) (Grandmont-Leblanc, 1979).

La méromyosine lourde (HMM) a été obtenue à partir de la myosine dissoute dans un tampon de KCl 0,5M, Tris HCl 0,02M, pH 7.6, d'après la méthode décrite par Lowey et Cohen (1962). La protéine est soumise à l'action de la trypsine pendant 10 minutes à 25°C, à raison de 50 µg de trypsine par ml de solution de myosine 15mg/ml. La digestion est arrêtée par 100 µg d'inhibiteur de trypsine par ml de solution de myosine 15mg/ml. La solution est dialysée contre 20 volumes de tampon phosphate 7×10^{-3} M pH 7.0, pour précipiter la méromyosine légère (LMM), puis centrifugée à 60 000g pendant 1 heure. Le surnageant contient la HMM.

6. Résultats

6.1 Préparations standard de cytoplasme démembré

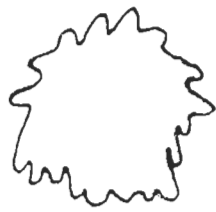
A- Microscopie optique

Lorsque la cellule est comprimée entre lame et lamelle dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970), à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP, la membrane se déchire en un point permettant ainsi au cytoplasme de s'écouler à l'extérieur. Ce cytoplasme démembré ne se disperse pas dans le milieu, mais demeure en une masse compacte à l'intérieur de laquelle se produit alors un ensemble de mouvements. Ces mouvements débutent à la périphérie puis s'étendent au cytoplasme entier: certaines parties du cytoplasme sont alors attirées au centre de la masse cytoplasmique et l'on observe des mouvements "en fontaine" semblables à ceux que l'on note dans le pseudopode de cellules intactes. Le cytoplasme se contracte ensuite en une masse plus dense d'où la plupart des organites cellulaires sont exclus. L'ensemble des mouvements dure de 2 à 10 minutes. Nous pensons que ces mouvements représentent une forme élémentaire du mouvement amiboïde (Figure 5).

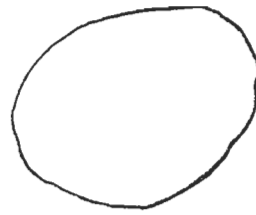
B- Microscopie électronique

La Figure 6 montre l'aspect typique d'une préparation standard de cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus* observée au microscope électronique après coloration négative. On y distingue essentiellement trois types de structures contractiles:

FIGURE 5 Technique de préparation du cytoplasme démembré d'Amoeba proteus. (1) Les cellules sont exposées à la solution standard de Gicquaud et Couillard: cette solution induit la pinocytose chez les amibes et la membrane cellulaire montre de nombreuses invaginations. (2) On comprime ces cellules entre lame et lamelle jusqu'à ce que la membrane se rompe. (3) Le cytoplasme s'écoule alors à l'extérieur, dans la solution standard. (4) Le cytoplasme ne se disperse pas mais reste en une masse compacte où l'on peut observer toute une série de mouvements. (5) Le cytoplasme se contracte ensuite en une masse plus dense d'où la plupart des organites sont exclus.



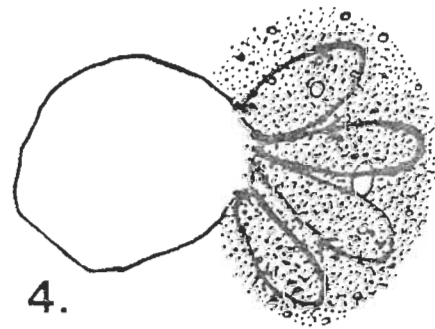
1.



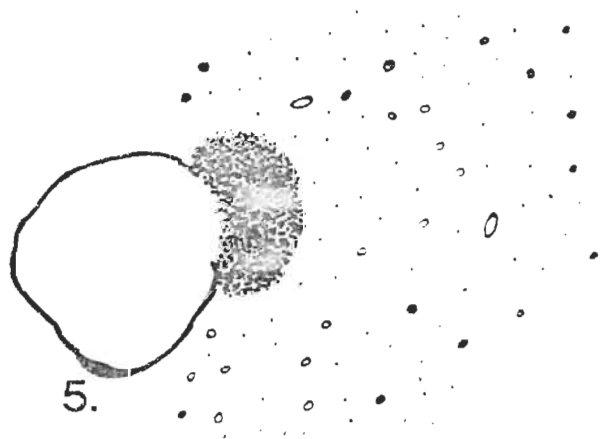
2.



3.



4.

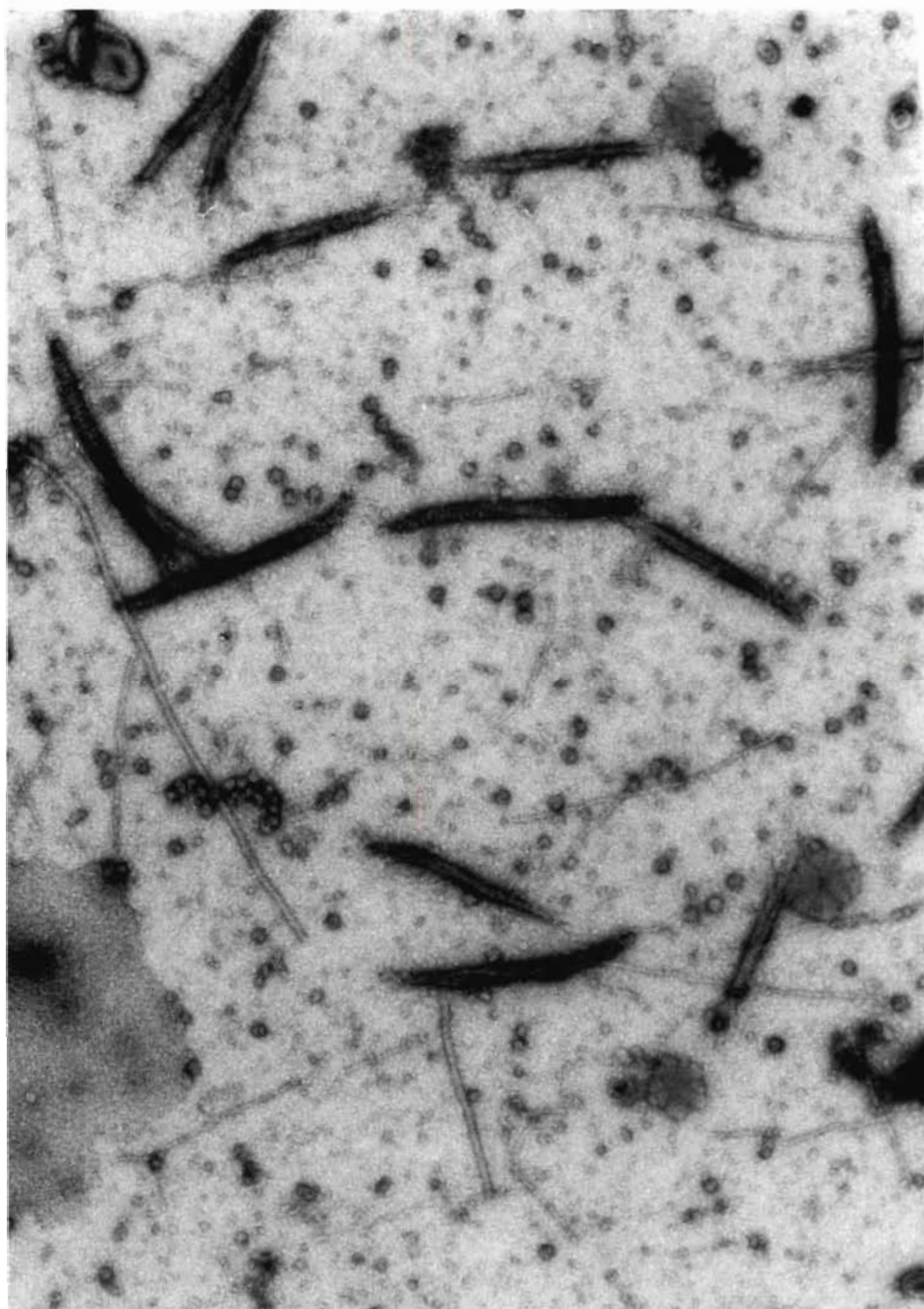


5.

FIGURE 5

FIGURE 6 Aspect typique d'une préparation standard (pH 7.2, en présence de 1mM d'ATP) de cytoplasme démembré d'Amoeba proteus observée au microscope électronique après coloration négative. On y distingue essentiellement trois types de structures: filaments épais, filaments fins et filaments de taille intermédiaire.

—— 58 000X



- 1- des filaments épais;
- 2- des filaments fins;
- 3- des filaments de taille intermédiaire.

Nous avons étudié plus en détail la morphologie de ces trois types de filaments.

. Morphologie des filaments épais

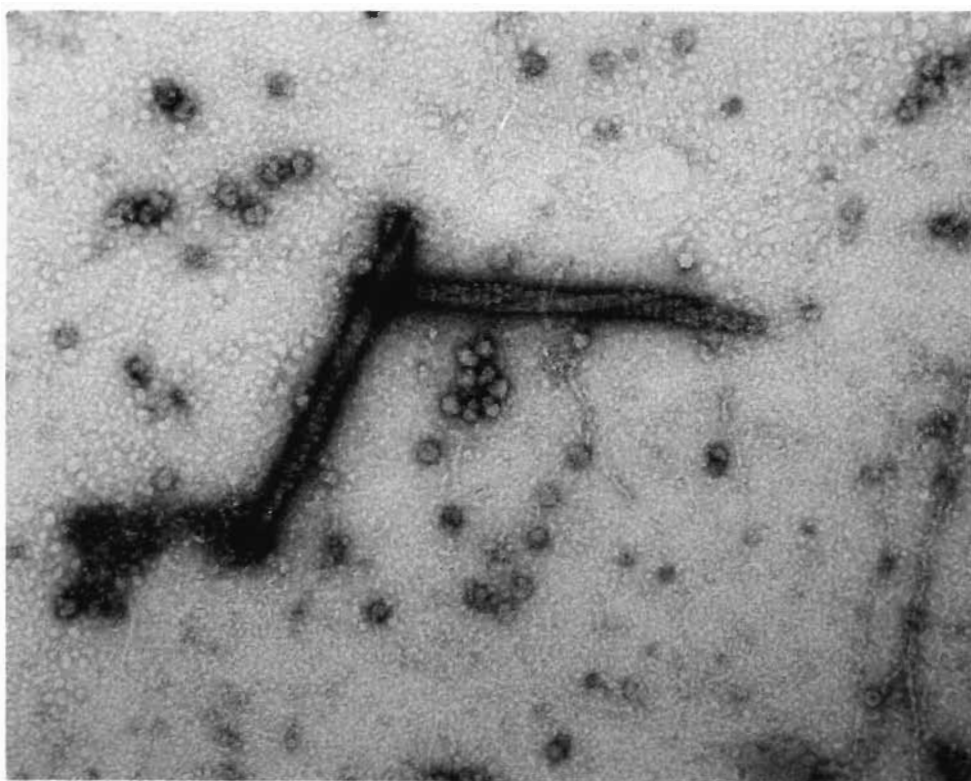
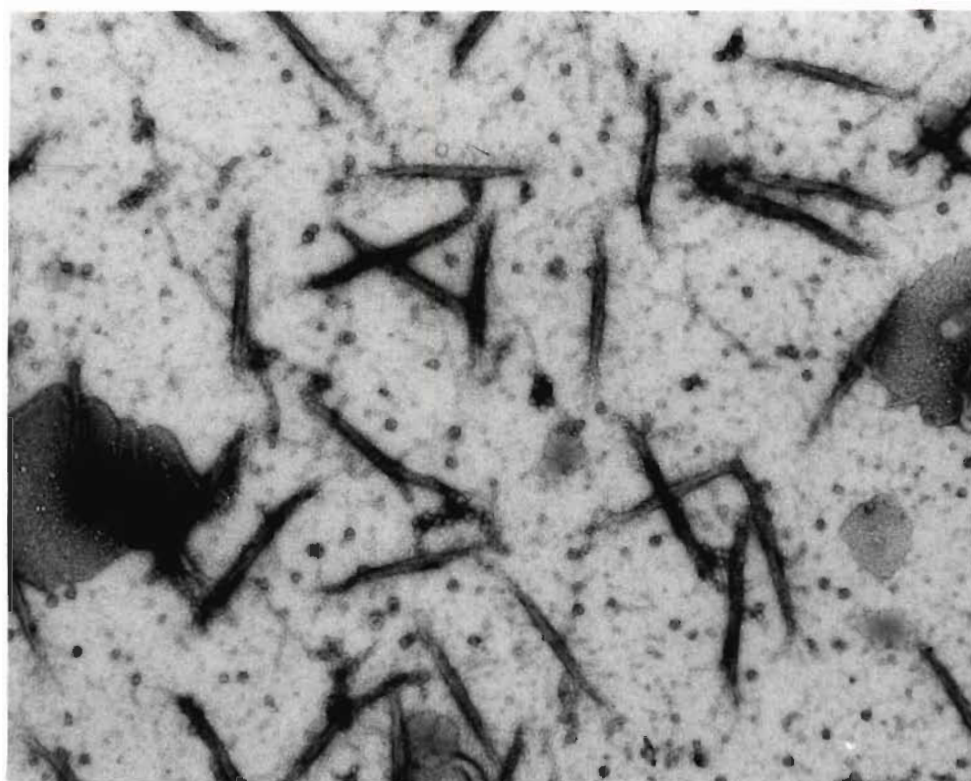
Les filaments épais ont 32nm de diamètre et 0,5 à 0,7 μ m de longueur (Figure 6). Chaque filament a une structure bipolaire typique (Figures 7a et 7b): on observe des unités globulaires enroulées spiralement aux deux extrémités et la partie centrale est lisse. L'ensemble du filament est généralement torsadé: ils ont l'aspect asymétrique des filaments de myosine isolés du muscle lisse et nous pensons qu'il s'agit d'une forme de myosine de l'amibe.

Gicquaud et Couillard (1971) et Taylor et collab. (1973) avaient antérieurement observé des filaments épais dans le cytoplasme démembrané d'Amoeba proteus. La morphologie de ces filaments se distinguait toutefois de celle que nous venons de décrire. Nous avons également retrouvé, dans nos préparations, des filaments de myosine morphologiquement identiques à ceux observés par ces auteurs (Figure 6, Figures 8a et 8b). Ce sont des filaments bipolaires mais on n'y observe plus d'unités globulaires aux extrémités: ils ont un aspect effiloché. Nous avons de plus observé quelques filaments à aspect mixte, c'est-à-dire portant des unités globulaires à une extrémité et effilochés à l'autre extrémité (Figure 9).

FIGURES 7a, 7b

Filaments de myosine portant des unités globulaires observés dans le cytoplasme d'Amoeba proteus par coloration négative.

—— a (photo du haut), 41 500 X; —— b (photo du bas), 94 000 X



FIGURES 8a, 8b

Filaments de myosine de type effiloché observés dans le cytoplasme d'Amoeba proteus par coloration négative.

—— a (photo du haut), 63 500 X; —— b (photo du bas),
94 000 X

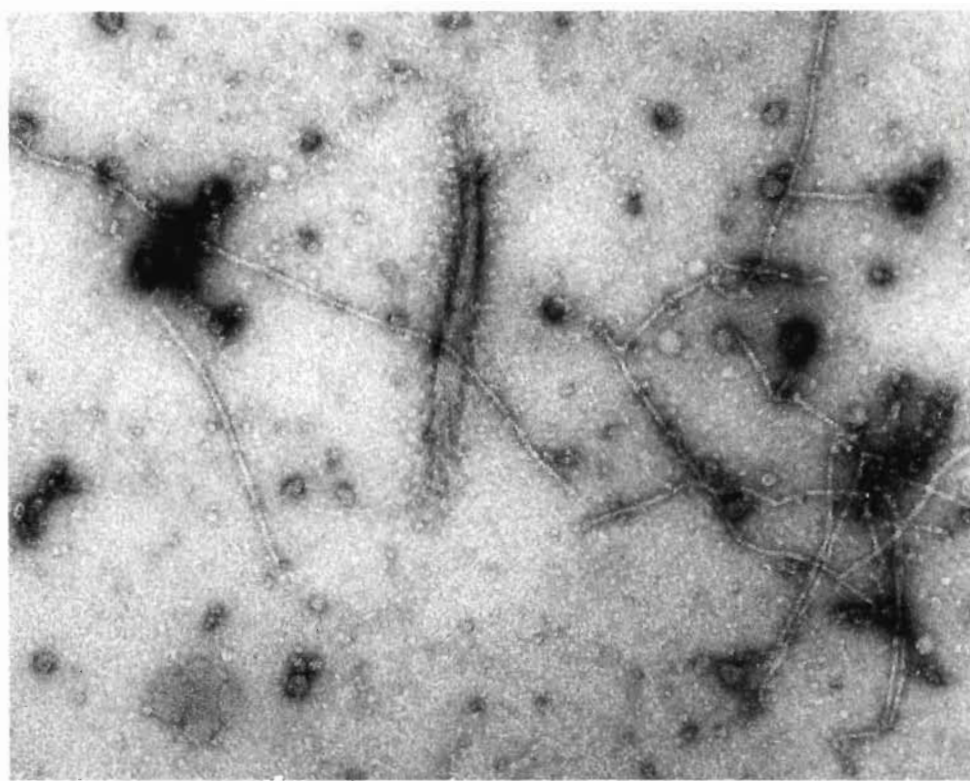
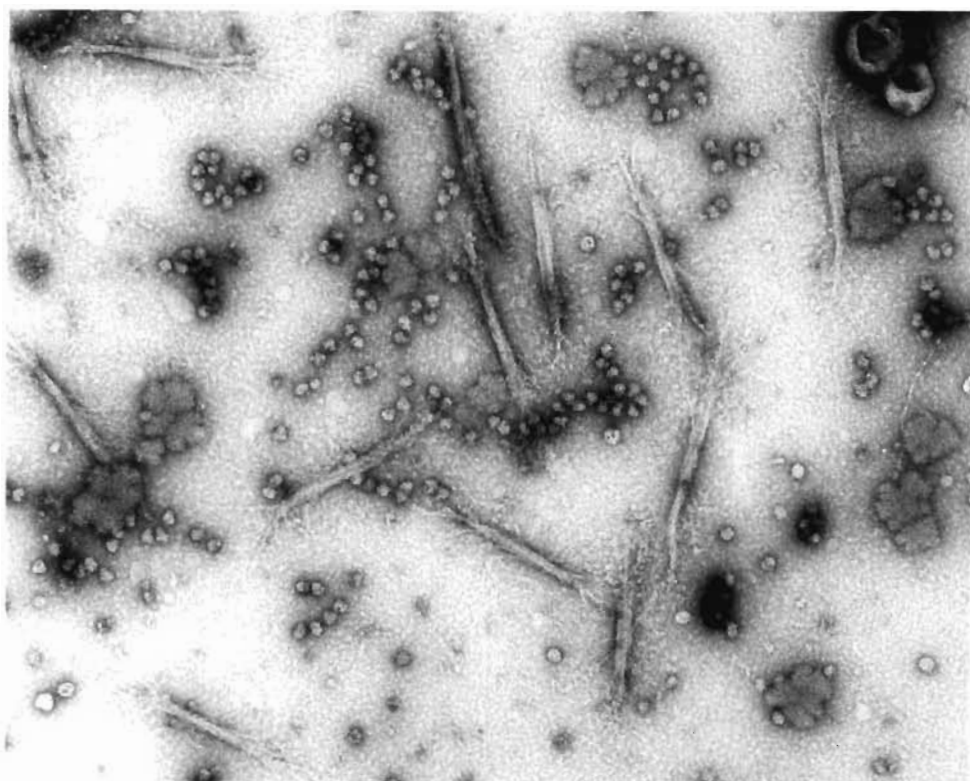
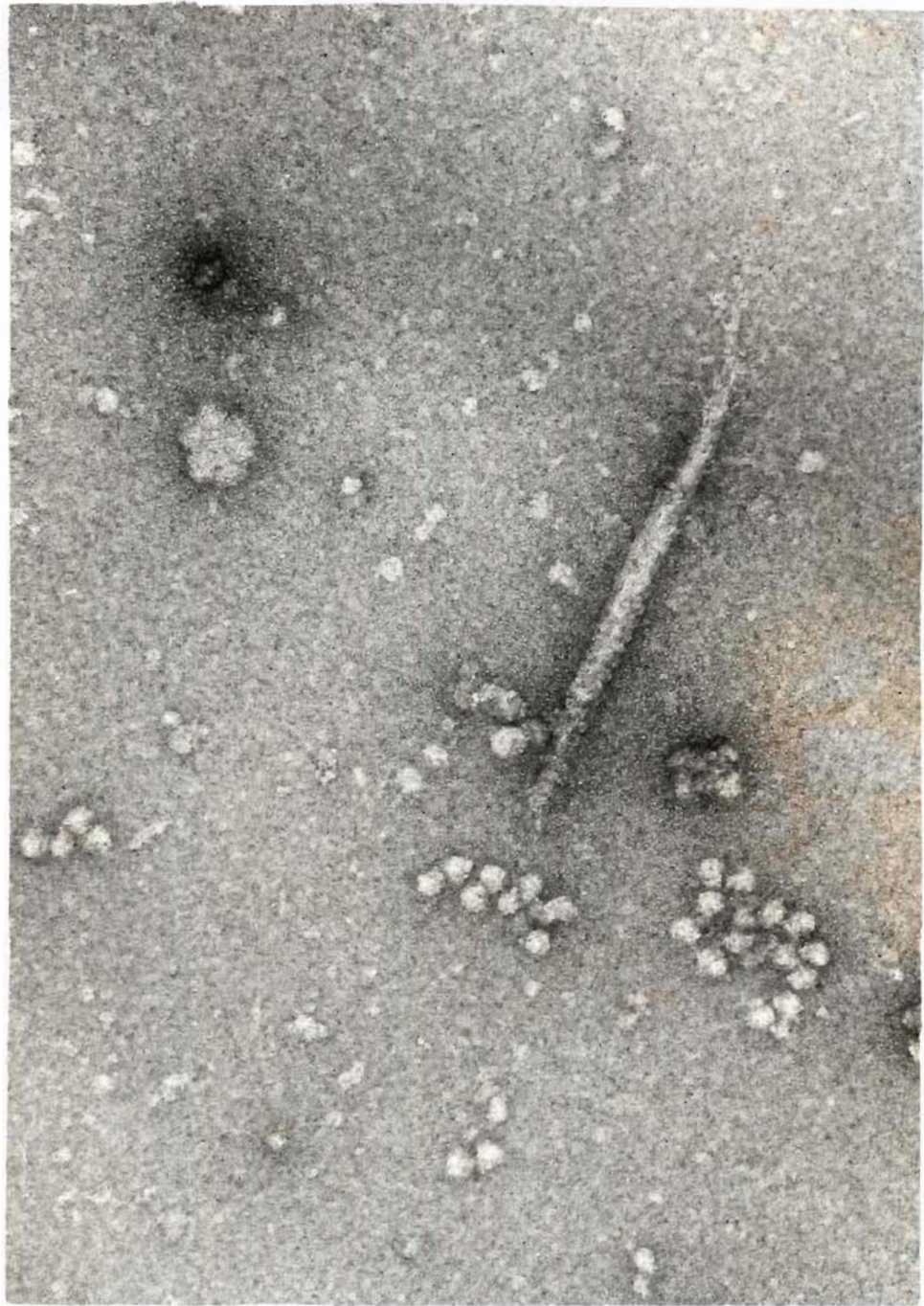


FIGURE 9 Filament de myosine à aspect mixte, c'est-à-dire portant
des unités globulaires à une extrémité et effiloché à
l'autre extrémité.
—— 131 000 X



Nous avons voulu vérifier si l'aspect effiloché de certains filaments pouvait être dû à l'action de protéases cytoplasmiques: clivage des têtes de myosine, modifications structurales des molécules de myosine... Nous avons donc laissé "vieillir" (30 minutes) des préparations de cytoplasme démembré avant de les colorer négativement. En laissant agir les protéases, nous nous attendions à privilégier ainsi l'aspect effiloché pour les filaments de myosine dans ces préparations. Nous y avons cependant retrouvé les deux types morphologiques dans des proportions comparables à celles des préparations standard. Nous ne pouvons donc pas attribuer l'aspect effiloché de certains filaments de myosine à leur dégradation par des protéases cytoplasmiques.

.. Morphologie des filaments fins

Les filaments fins ont 7nm de diamètre. Ces filaments peuvent être décorés en absence d'ATP par la méromyosine lourde (HMM) (Figure 10). Ils sont donc composés d'actine. Dans nos préparations standard, c'est-à-dire réalisées dans le milieu de Gicquaud et Couillard à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP, ces filaments d'actine sont rares et même totalement absents sur certaines grilles. Fait particulier à souligner, certains filaments d'actine ne sont pas rectilignes, comme c'est le cas des filaments d'actine musculaire purifiée observés *in vitro*, mais montrent souvent des ramifications: ils ont une structure en ligne brisée (Figure 11). En général, dans 70% des observations, trois segments de filaments d'actine émergent d'un même point de ramification pour former un Y: ces ramifications pourraient être constituées de deux ou trois filaments d'actine liés entre eux. Dans les autres cas, on peut observer quatre segments arrangés en X: on ne peut alors affirmer que ces filaments sont liés entre eux puisqu'il pourrait s'agir simplement

FIGURE 10 Filaments d'actine d'Amoeba proteus décorés à l'HMM.

—— 58 000 X

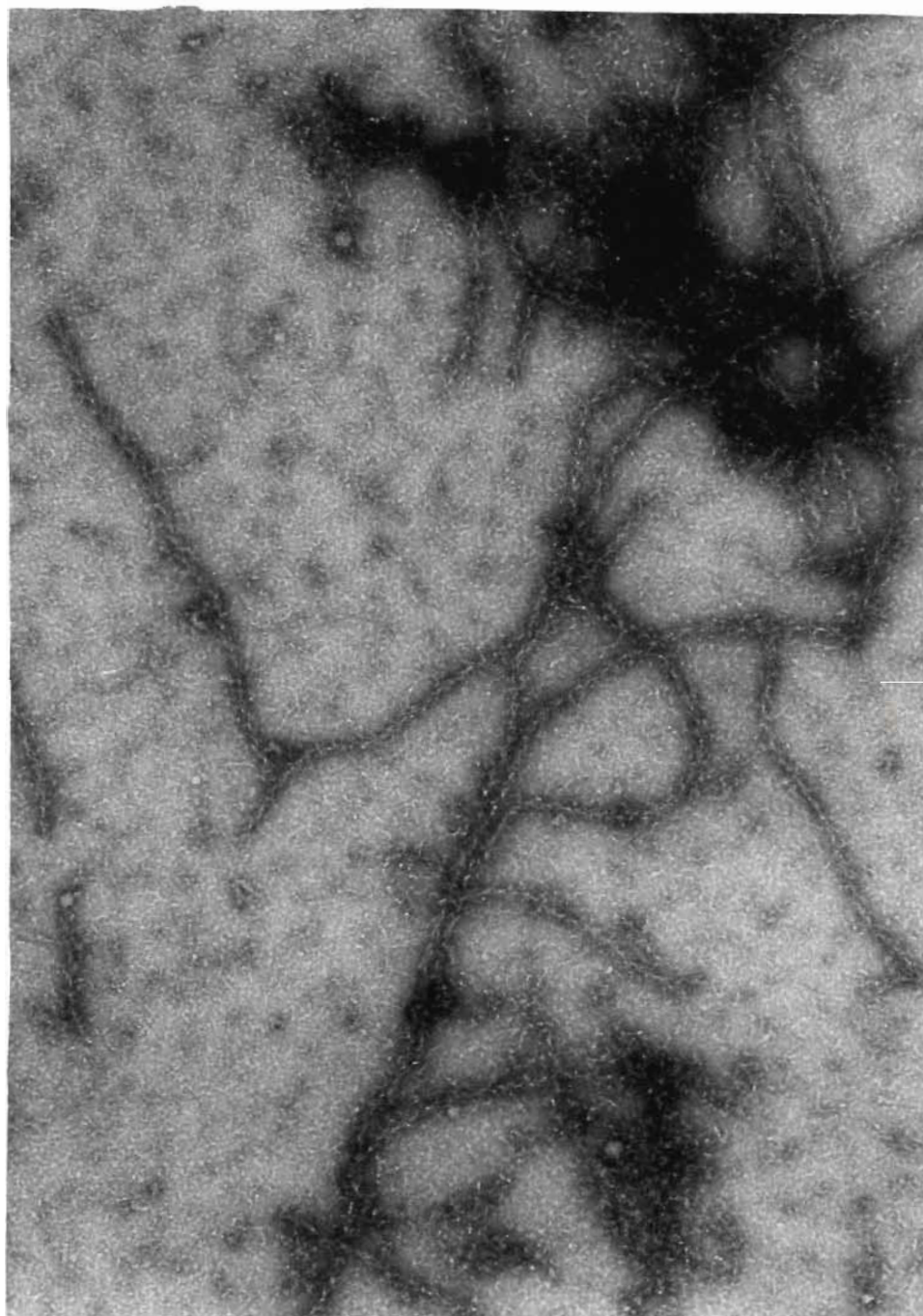
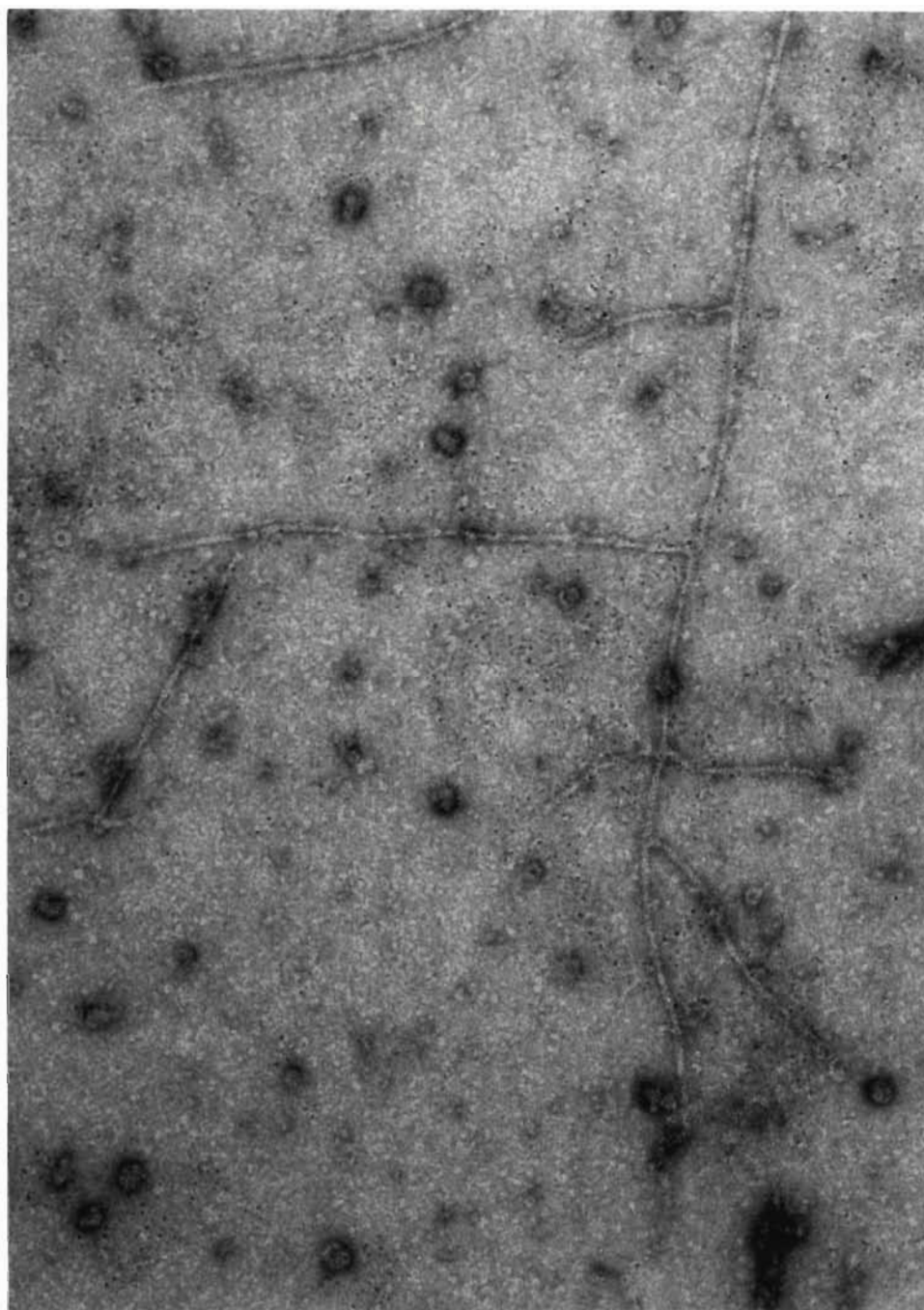


FIGURE 11 Filaments d'actine ramifiés observés dans le cytoplasme
d'Amoeba proteus après coloration négative.
—— 131 000 X



de la superposition de deux filaments d'actine sur la grille ou de quelqu'autre artéfact.

... Morphologie des filaments de taille intermédiaire

Les filaments de taille intermédiaire ont de 10 à 12nm de diamètre (Figure 6). A notre connaissance, ce type de filaments n'avait pas été observé dans le cytoplasme d'amibes avant le présent travail. Leur aspect morphologique (Figures 12a et 12b) s'apparente à celui d'autres filaments de taille intermédiaire observés dans diverses cellules (Schlaepfer, 1977a; Schlaepfer, 1977b).

Dans nos préparations, ces filaments sont rectilignes, sans ramification. Ils semblent constitués de deux protofilaments. Ils sont généralement peu nombreux. On les retrouve parfois à proximité de débris membranaires (Figure 13): cet arrangement suggère une interaction possible de ces filaments avec les membranes.

.... Dans ces préparations standard, nous avons également observé d'autres structures susceptibles d'être impliquées dans les phénomènes motiles de cette amibe

La Figure 14 montre des structures en forme d'"anneau" semblables morphologiquement à l'"actin-binding"protéine des macrophages caractérisée par Stossel et Hartwig (1975). Taylor et collab. (1976) avaient précédemment souligné la présence de ces structures dans des extraits cytoplasmiques d'Amoeba proteus. On les retrouve sur quasi toutes les micrographies.

FIGURES 12a, 12b

Filaments de taille intermédiaire observés dans le cytoplasme d'Amoeba proteus après coloration négative.

—— a (photo du haut), 63 500 X; —— b (photo du bas), 94 000 X

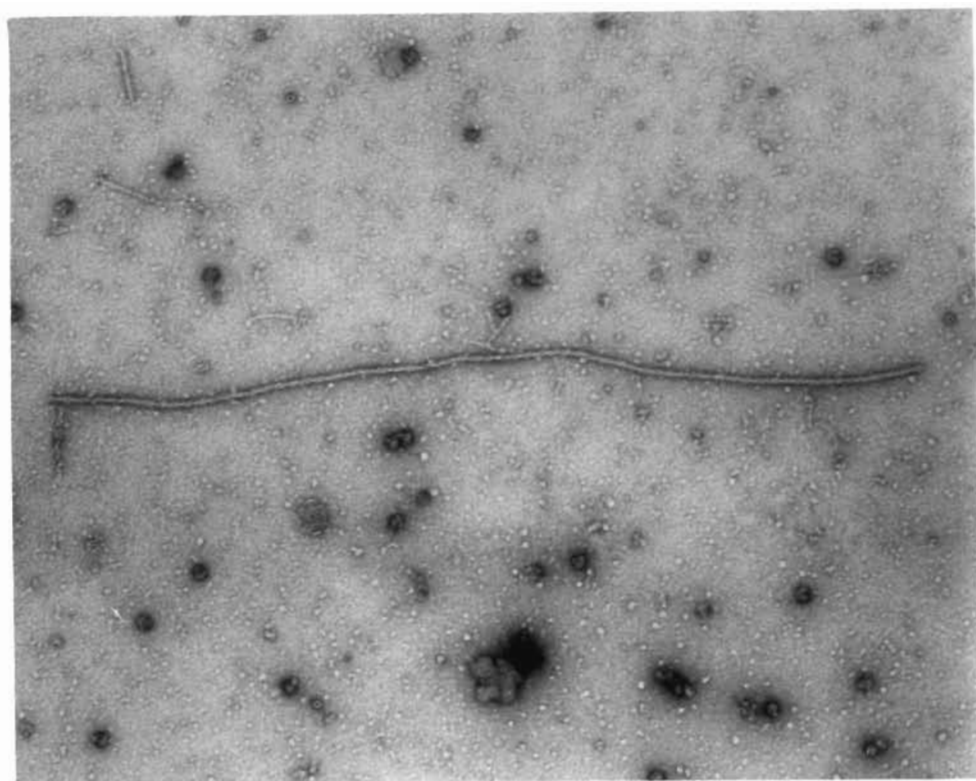
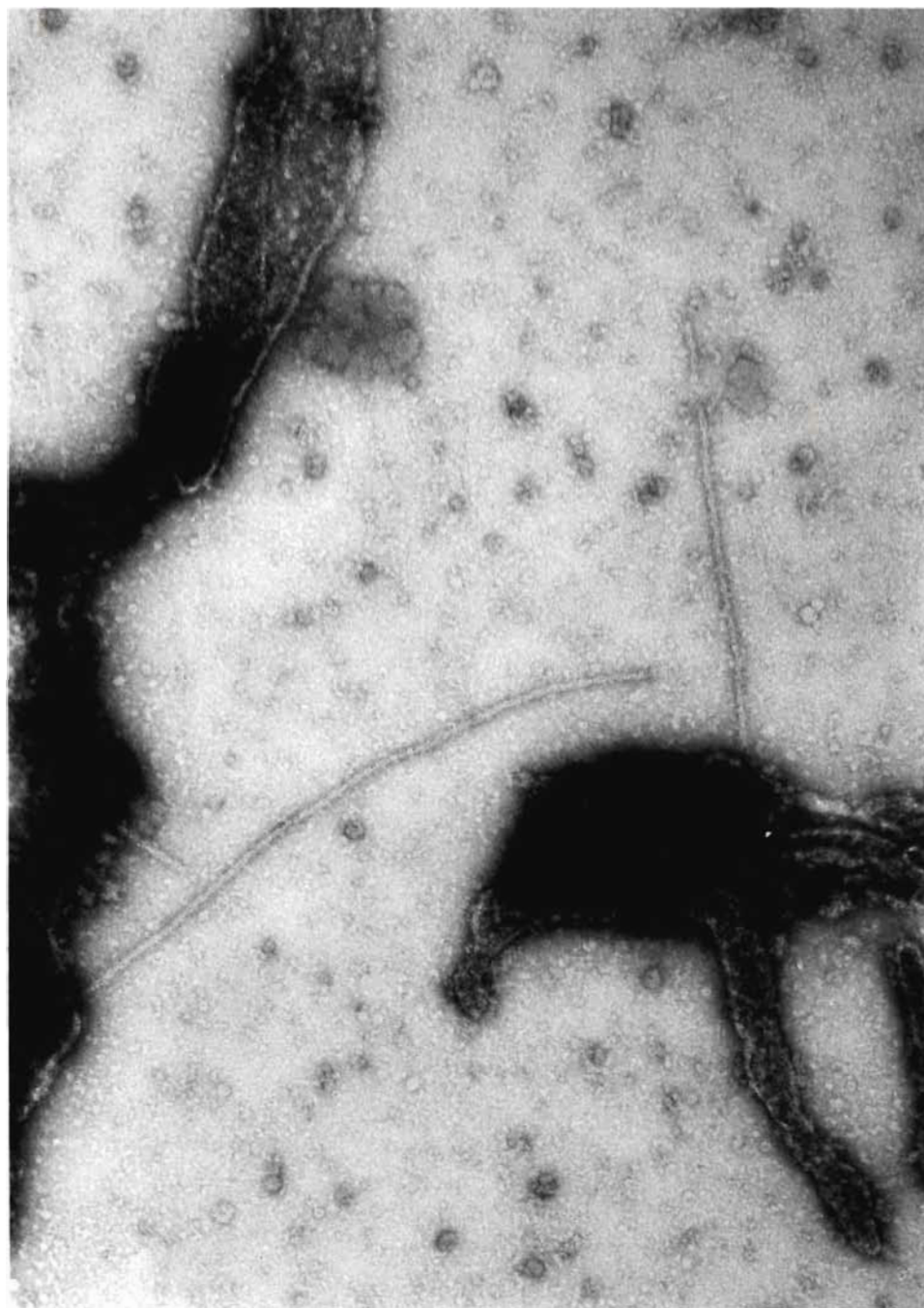


FIGURE 13 Filaments de taille intermédiaire à proximité de
débris membranaires.

—— 88 500 X



Sur la Figure 14, on peut voir une région particulièrement riche en "anneaux".

Nous avons également relevé la présence de petits filaments d'environ 3nm de diamètre (Figure 15). Ils sont parfois arrangés en treillis. Morgan et collab. (1967) avaient antérieurement signalé la présence de ce type de filaments dans Amoeba proteus. De nombreuses recherches ultérieures sur l'ultrastructure d'Amoeba proteus n'avaient pas confirmé cette observation. Nous pensons qu'il peut s'agir ici des mêmes filaments observés par Morgan et collab. (1967).

Enfin, nous avons observé, à quelques reprises, des structures morphologiquement semblables aux filaments d'actine décorés à l'HMM (Figure 16). Ce pourrait être des filaments d'actine cytoplasmique décorés naturellement par une myosine monomérique, c'est-à-dire une forme d'actomyosine cytoplasmique.

6.2 Effets de la phalloïdine sur le cytoplasme d'Amoeba proteus

A- Microscopie optique

Le cytoplasme démembré exposé à $2 \times 10^{-6} \text{M}$ et $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de phalloïdine dans la solution de Gicquaud et Couillard (1970), pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP, montre en microscopie optique des mouvements cytoplasmiques normaux comparables à ceux des préparations standard. De plus, les organites cellulaires (noyau, mitochondries, vacuole contractile) conservent un aspect normal en microscopie optique.

FIGURE 14 Structures en forme d'"anneau" observées dans le cytoplasme d'Amoeba proteus après coloration négative.
—— 131 000 X

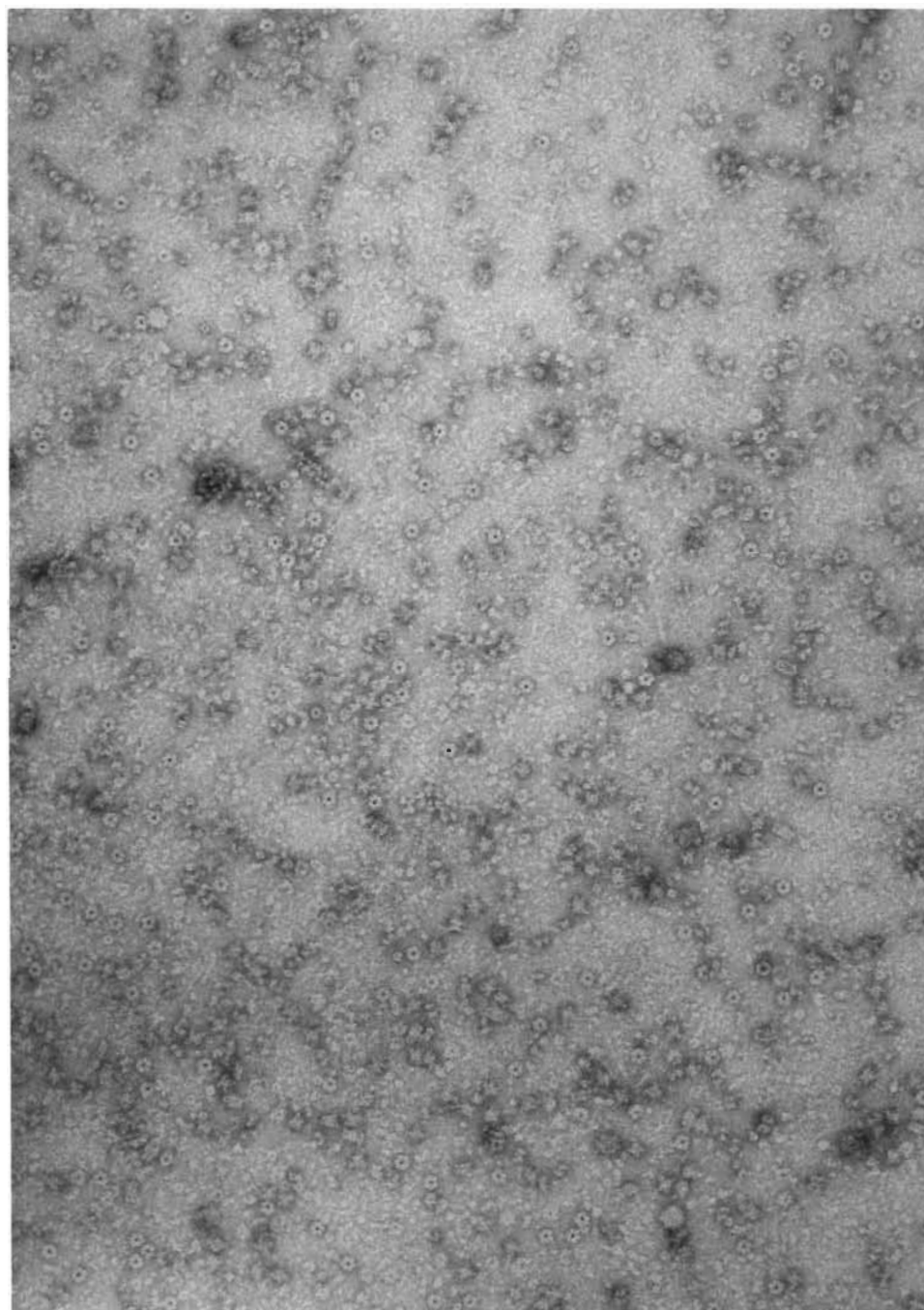


FIGURE 15 Petits filaments d'environ 3nm de diamètre observés
dans le cytoplasme d'Amoeba proteus après coloration
négative. Ils sont arrangés ici en un treillis.
—— 58 000 X

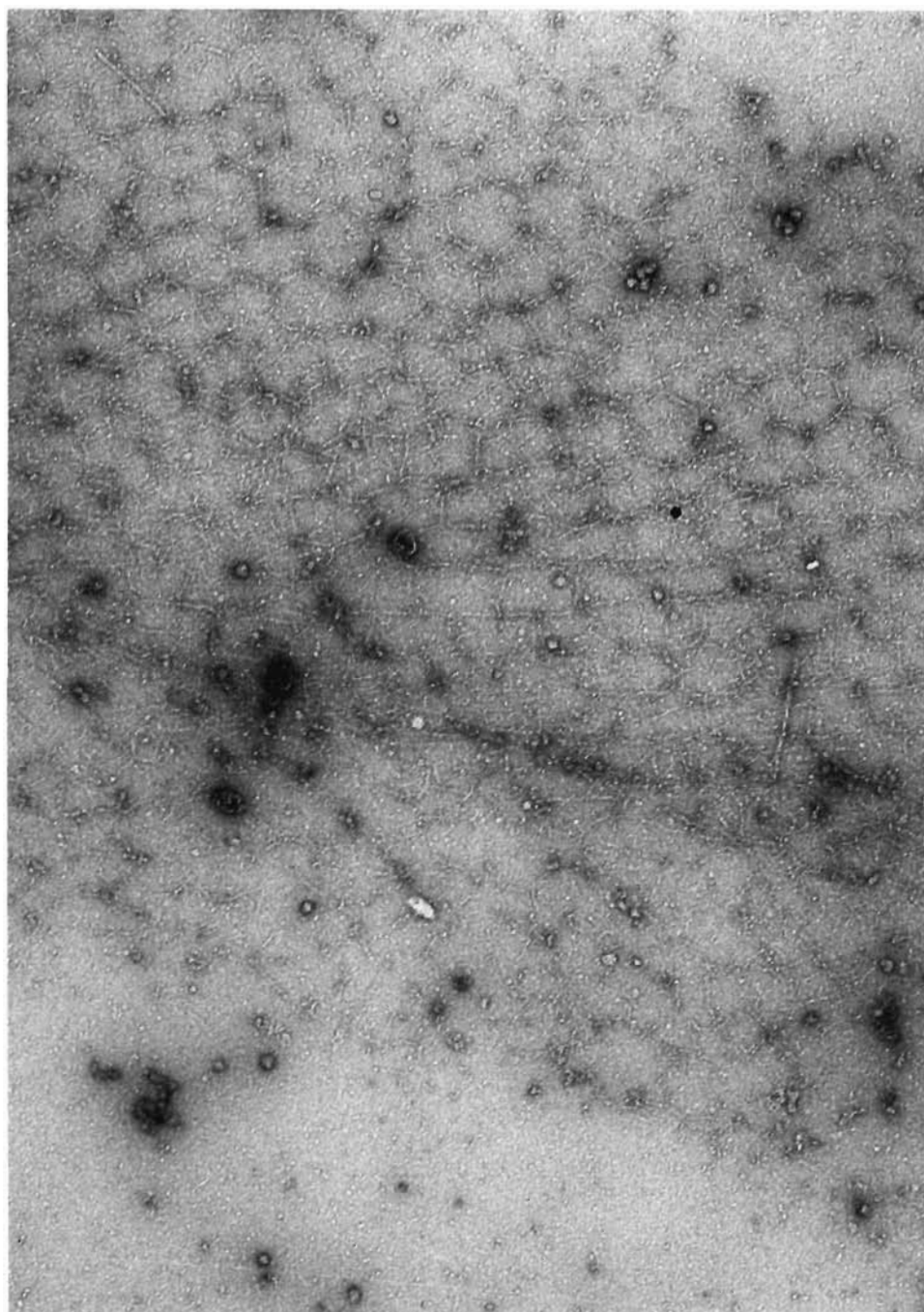
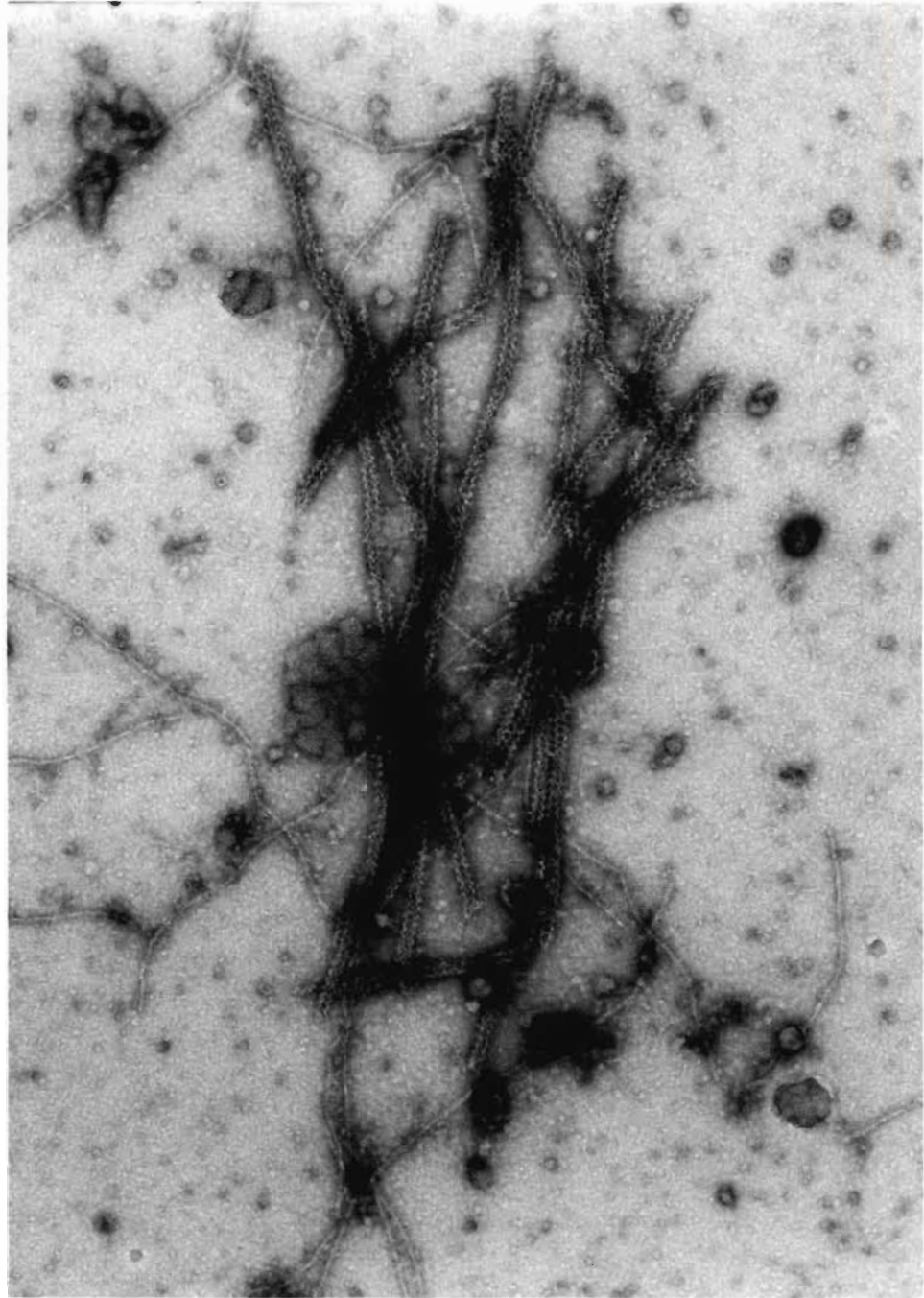


FIGURE 16 Structures morphologiquement semblables à des filaments d'actine décorés à l'HMM, observées dans le cytoplasme d'Amoeba proteus après coloration négative.
—— 88 500 X



Par contre, les préparations exposées à de plus fortes concentrations de phalloïdine, soient 10^{-5}M et $2 \times 10^{-5}\text{M}$, sont fortement affectées. Les cellules sont difficiles à briser. Le cytoplasme qui se répand dans le milieu ne montre pas de mouvement. On y observe de nombreuses fibrilles, visibles au microscope optique, qui rayonnent de la masse cytoplasmique. Les organites cellulaires ne semblent toutefois pas altérés par ces concentrations de toxine.

B- Microscopie électronique

En microscopie électronique, nous n'avons noté aucun effet de la phalloïdine à des concentrations plus faibles que $2 \times 10^{-6}\text{M}$ et l'aspect des préparations exposées à de telles concentrations de toxine est semblable à celui des préparations standard (Figure 17).

Dans les préparations exposées à $2 \times 10^{-6}\text{M}$ de phalloïdine, les filaments d'actine sont plus nombreux (Figure 18). A $5 \times 10^{-6}\text{M}$ de toxine, on observe une prolifération spectaculaire des filaments d'actine (Figure 19): ils forment alors des réseaux tridimensionnels à l'intérieur desquels on retrouve des filaments de myosine (Figure 20). Dans ces préparations, tout comme dans les préparations standard, les filaments d'actine sont parfois ramifiés ou en ligne brisée (Figure 21). A quelques reprises, nous avons noté la présence de filaments d'actine enchevêtrés dans des agrégats de matériel amorphe (Figure 22) ou encore à proximité de débris membranaires (Figure 23).

Dans les préparations exposées à de plus fortes concentrations de

FIGURE 17 Préparation de cytoplasme démembré exposé à des concentrations de phalloïdine plus faibles que $2 \times 10^{-6} \text{M}$, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP.

—— 88 500 X

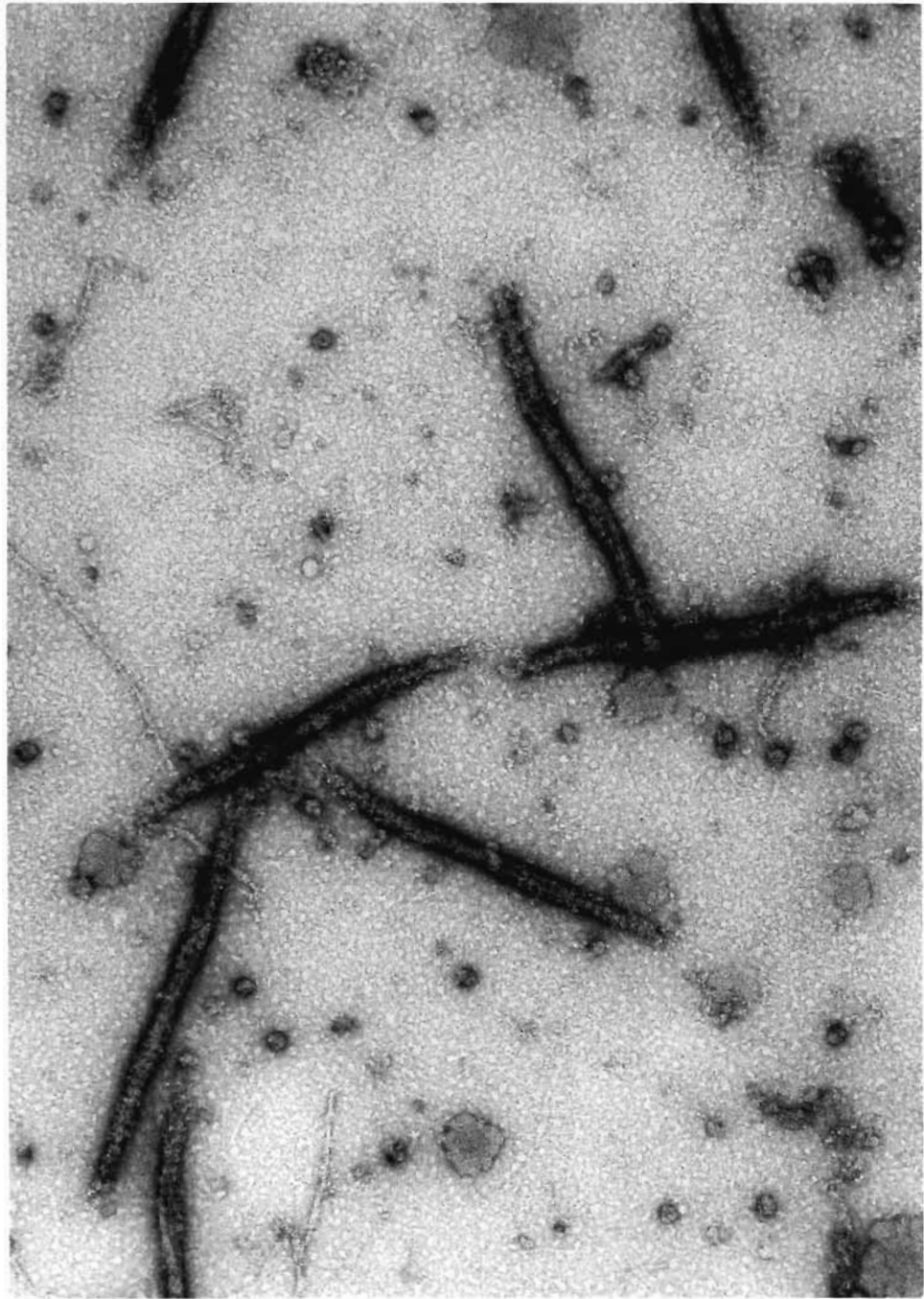


FIGURE 18 Préparation de cytoplasme démembré exposé à une concentration de $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ de phalloïdine, à pH 7.2, en présence de 1mM d'ATP.

—— 88 500 X

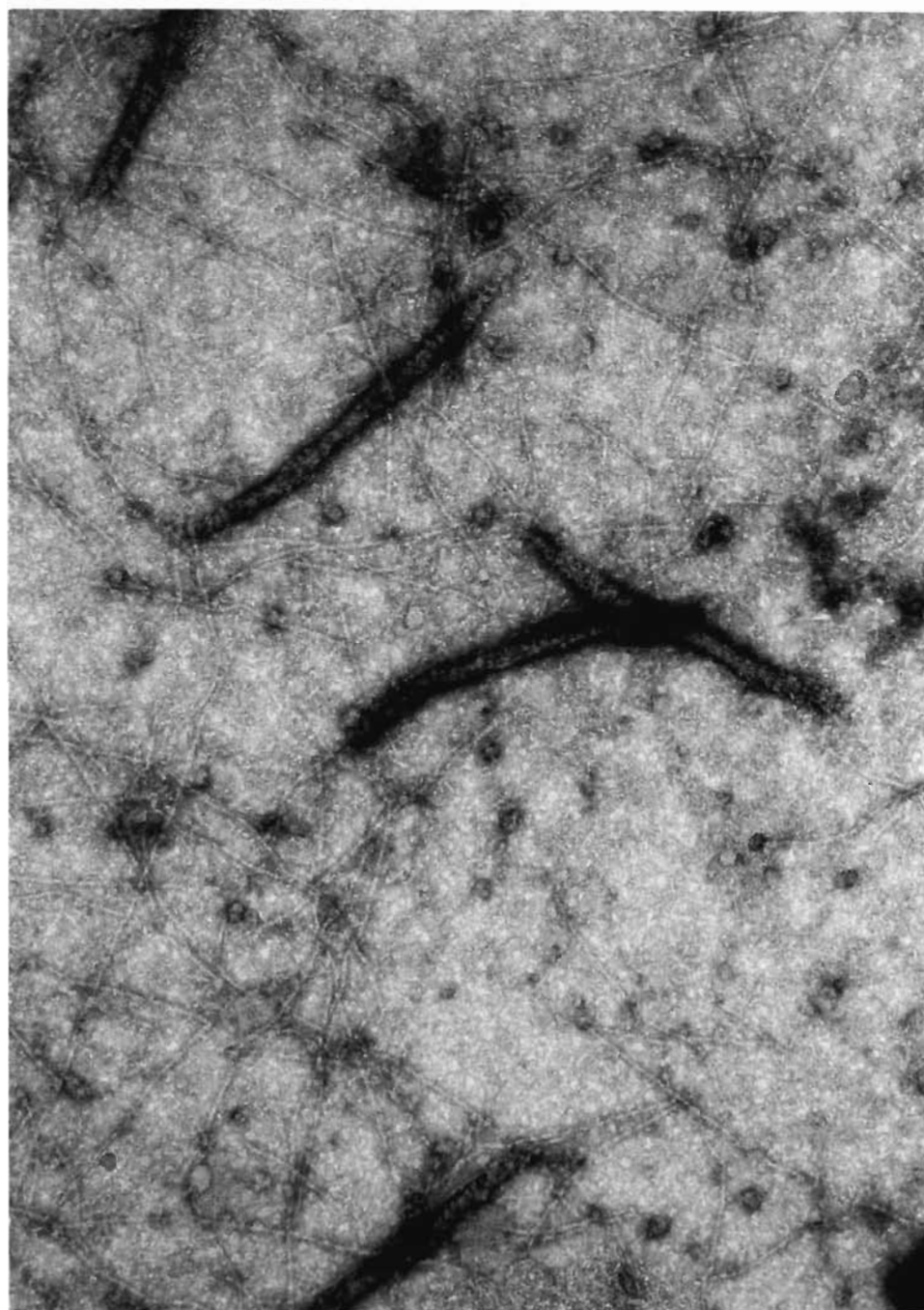


FIGURE 19 Préparation de cytoplasme démembrané exposé à une concentration de 5×10^{-6} M de phalloïdine, à pH 7.2, en présence de 1mM d'ATP. On observe ici, à faible grossissement, une prolifération spectaculaire des filaments d'actine.

—— 20 500 X

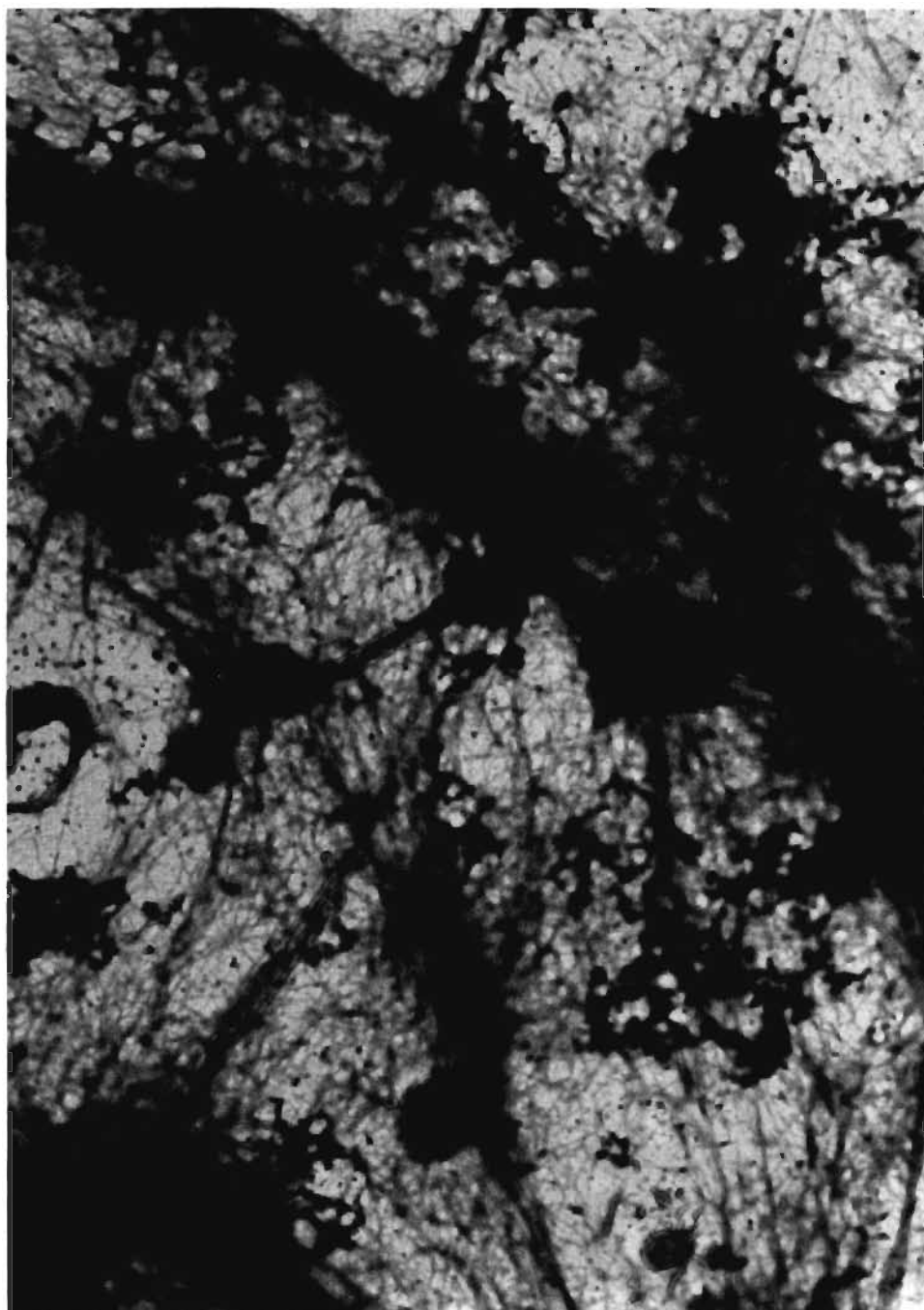


FIGURE 20 Préparation de cytoplasme démembré exposé à une concentration de 5×10^{-6} M de phalloïdine, à pH 7.2, en présence de 1mM d'ATP. Les filaments d'actine sont arrangés en réseau tridimensionnel.

—— 88 500 X

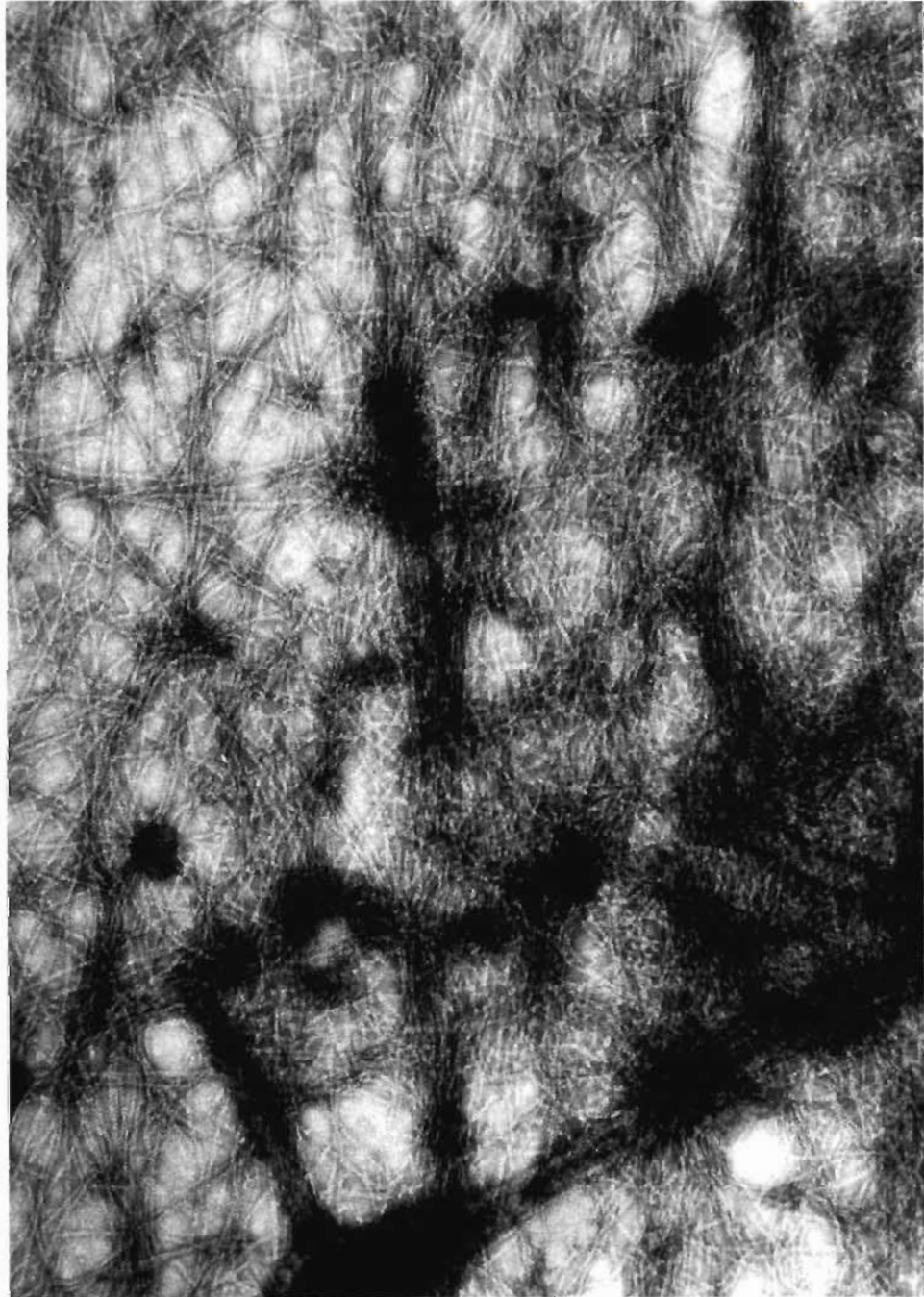


FIGURE 21 Filaments d'actine ramifiés dans une préparation de cytoplasme démembrané exposé à la phalloïdine ($5 \times 10^{-6} \text{M}$), à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP.

—— 131 000 X

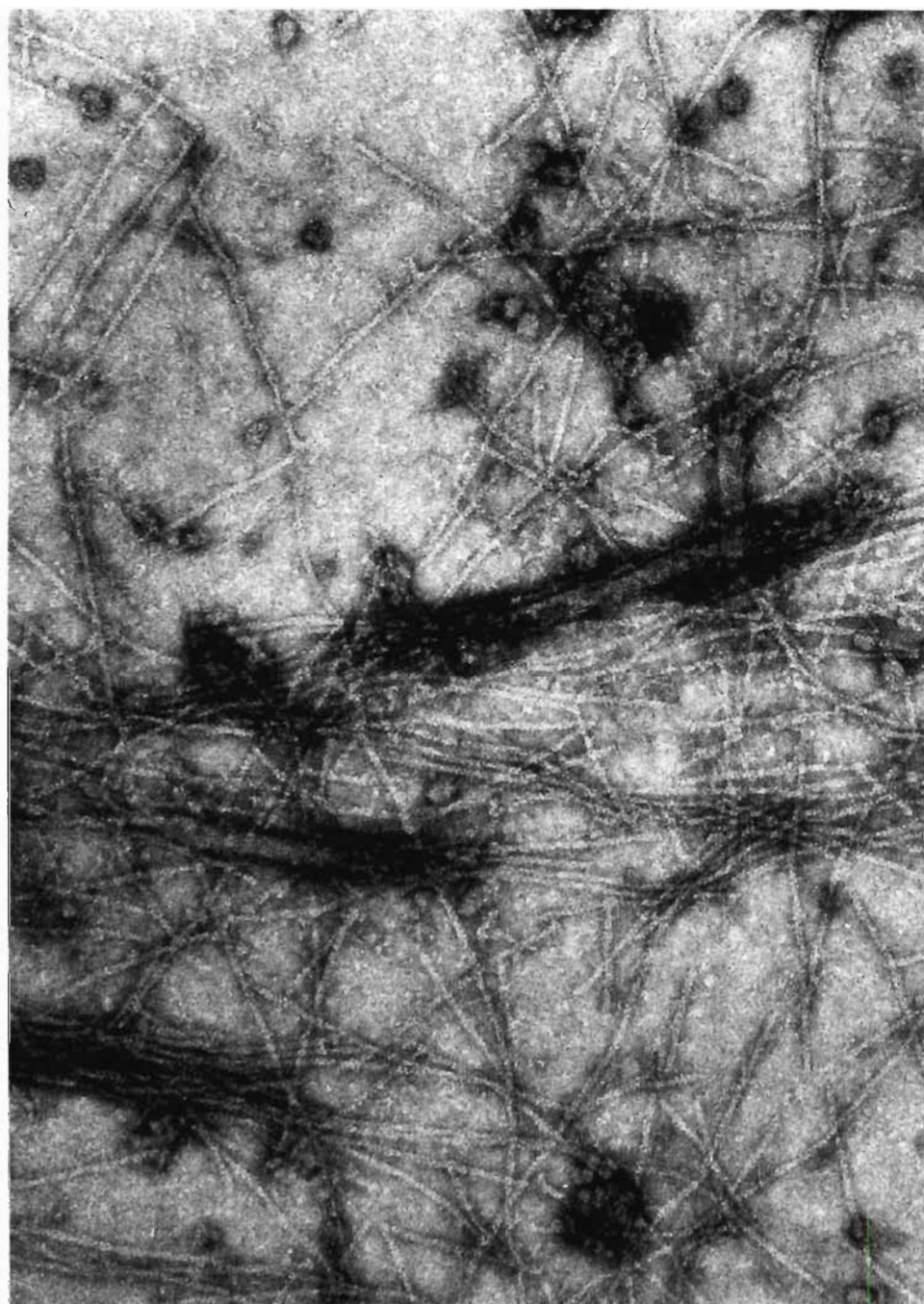


FIGURE 22 Filaments d'actine enchevêtrés dans des agrégats de matériel amorphe, observés dans une préparation exposée à la phalloïdine ($5 \times 10^{-6} \text{M}$), à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP.

—— 88 500 X

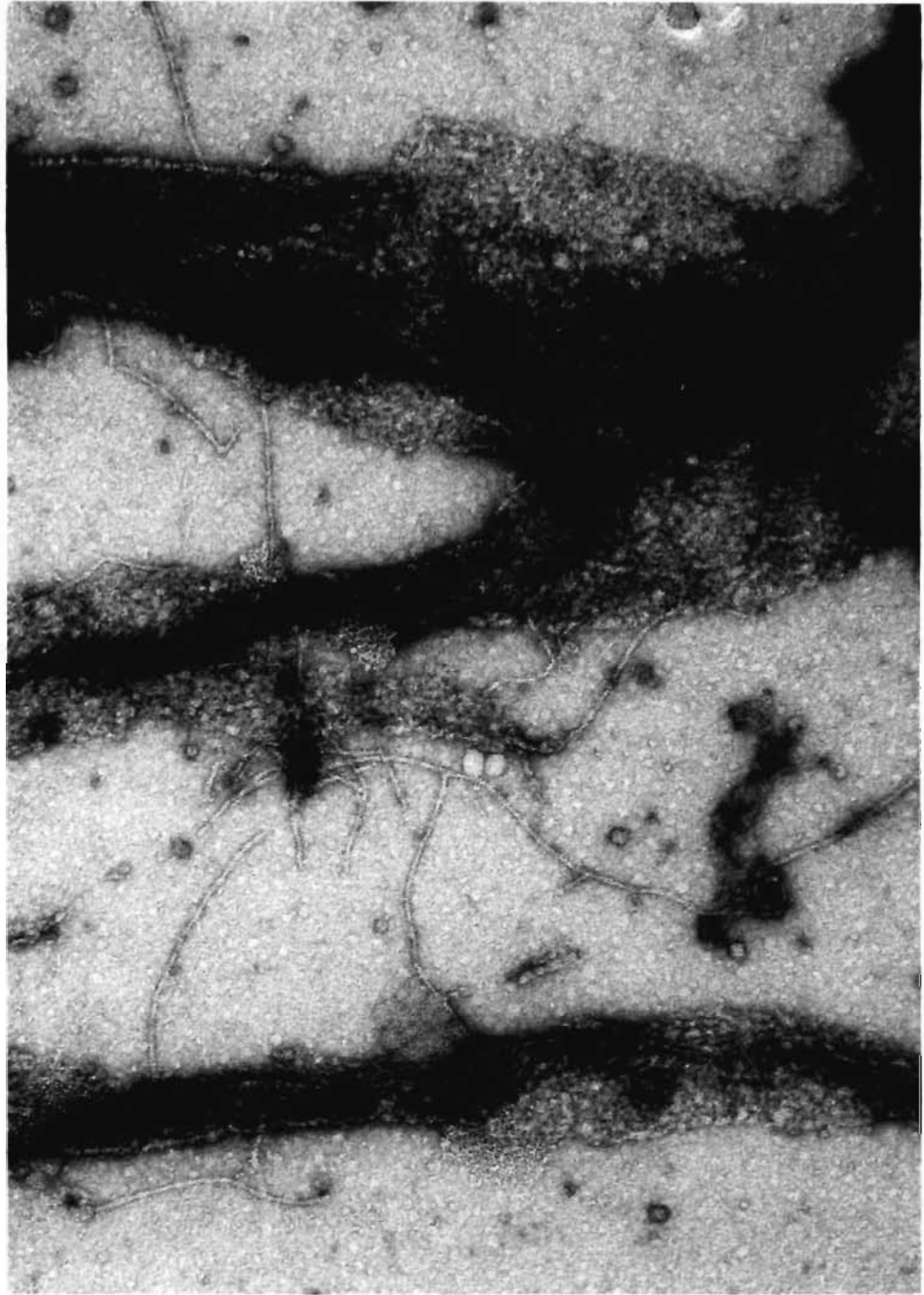
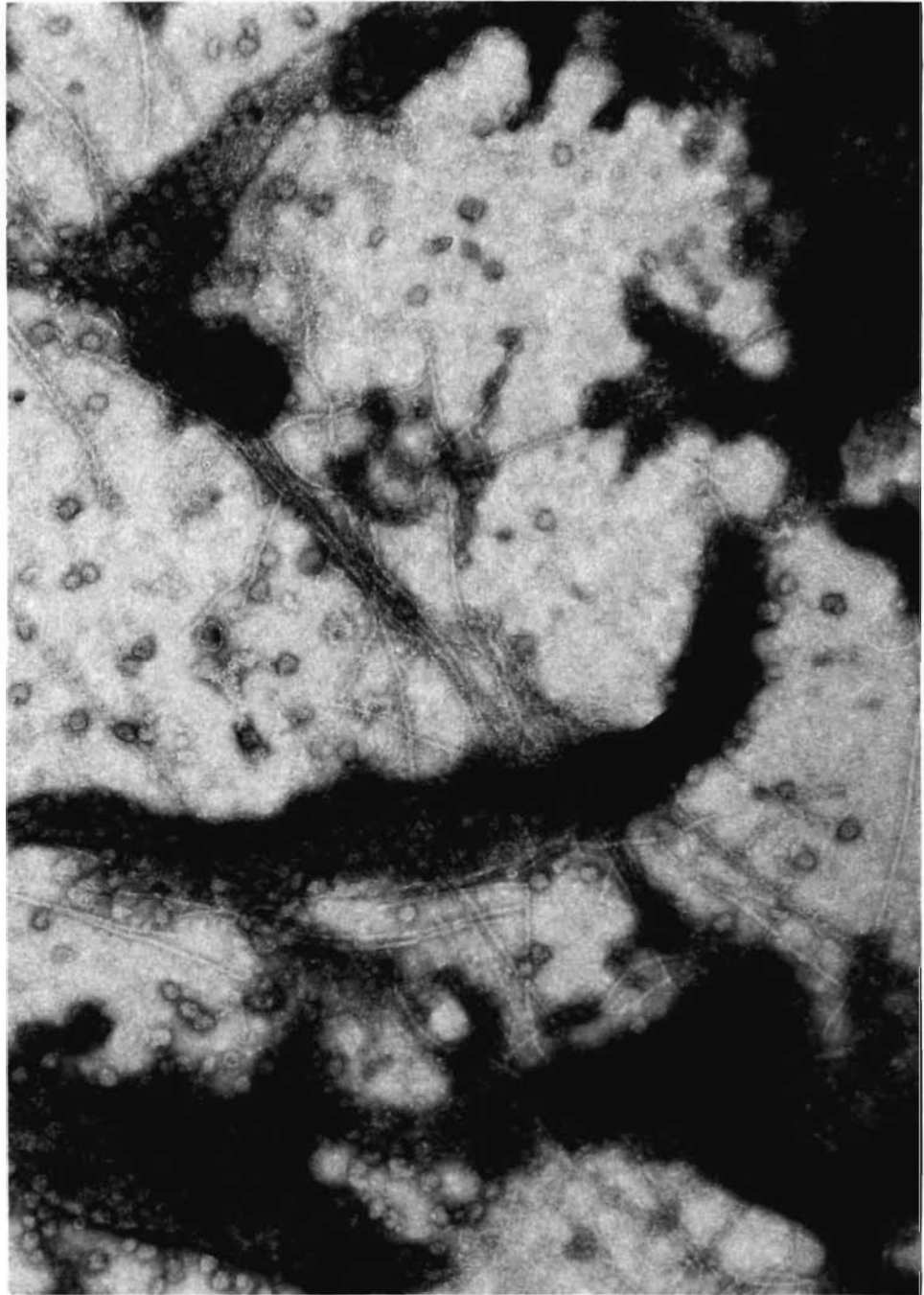


Figure 23. Filaments d'actine à proximité de débris membranaires observés dans une préparation exposée à la phalloïdine ($5 \times 10^{-6} \text{M}$), à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP.

—— 88 500x



toxine, soient 10^{-5}M et $2 \times 10^{-5}\text{M}$, la prolifération des filaments d'actine s'accroît davantage. On y observe toutefois une réorganisation de ces filaments: ils ont tendance à s'agréger pour former des fibrilles de plusieurs μm de largeur (Figures 24 et 25). Nous croyons que ces fibrilles sont celles que nous avons observées au microscope optique. Elles sont parfois si épaisses et compactes qu'il n'est plus possible, en général, d'en distinguer la structure fine au microscope électronique après coloration négative (Figure 26).

Le Tableau 1 résume l'influence de la phalloïdine sur le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus*. Cette action est spécifique à l'actine. Nous n'avons noté aucun effet de la toxine sur les filaments de myosine ou sur les filaments de taille intermédiaire, en microscopie électronique.

6.3 Effets de la viroïsine sur le cytoplasme d'*Amoeba proteus*

Nous avons exposé le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus* à une autre toxine, la viroïsine. Nous avons utilisé une concentration de $5 \times 10^{-6}\text{M}$ de viroïsine dans la solution de Gicquaud et Couillard (1970), c'est-à-dire à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP.

A- Microscopie optique

En microscopie optique, les préparations exposées à $5 \times 10^{-6}\text{M}$ de viroïsine se "comportent" différemment du cytoplasme démembré exposé à la même concentration de phalloïdine. Dès que la membrane est rompue, le cytoplasme

FIGURE 24 Préparation de cytoplasme démembrané exposé à une concentration de $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ de phalloïdine, à pH 7.2, en présence de 1mM d'ATP. Ici, à faible grossissement, on observe la présence de fibrilles. Ces fibrilles sont en partie constituées de filaments d'actine arrangés parallèlement.

—— 20 500 X

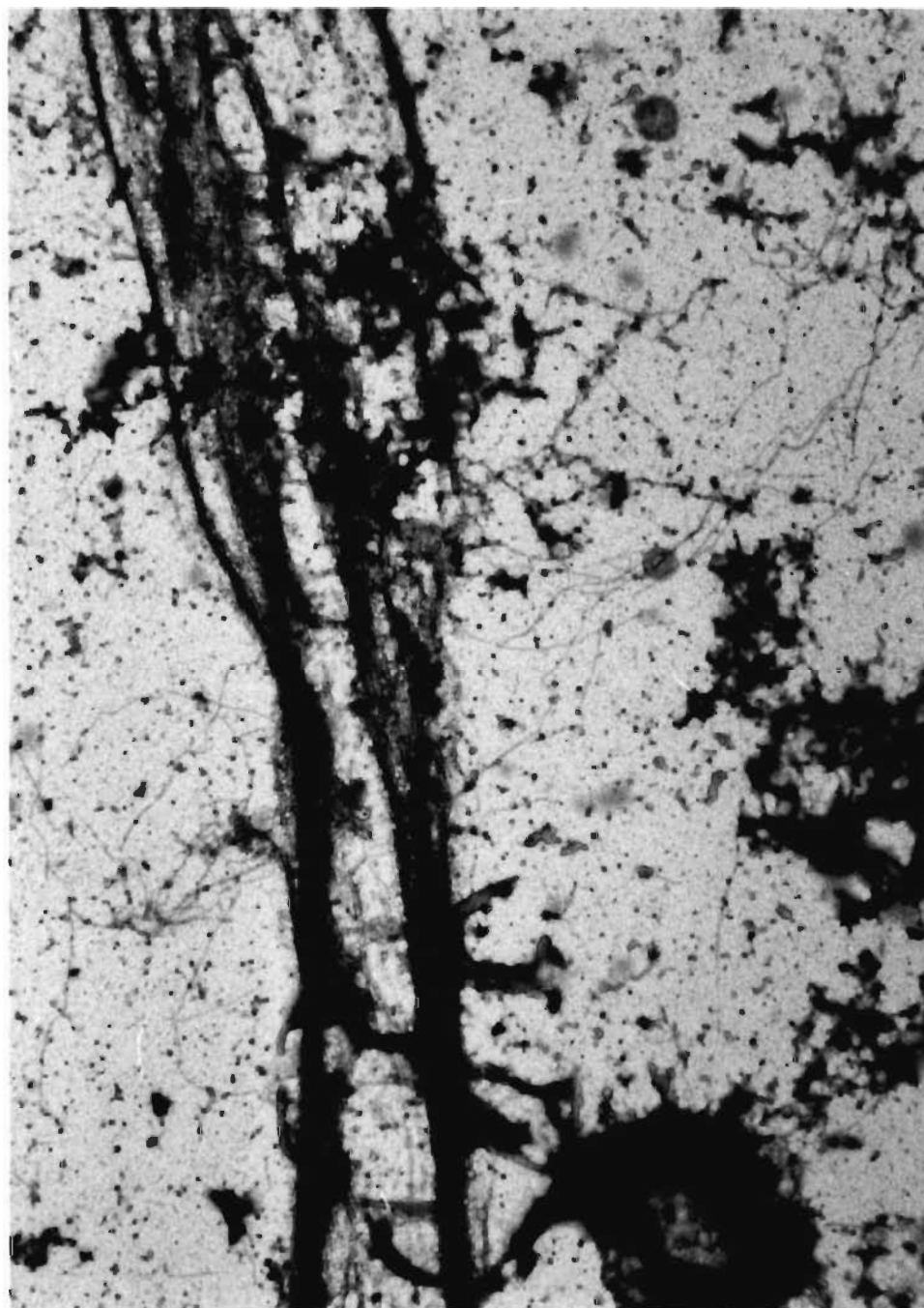


FIGURE 25

Préparation de cytoplasme démembré exposé à une concentration de 10^{-5} M de phalloïdine, à pH 7.2, en présence de 1mM d'ATP. Les filaments d'actine sont arrangés parallèlement en faisceaux.

—— 88 500 X

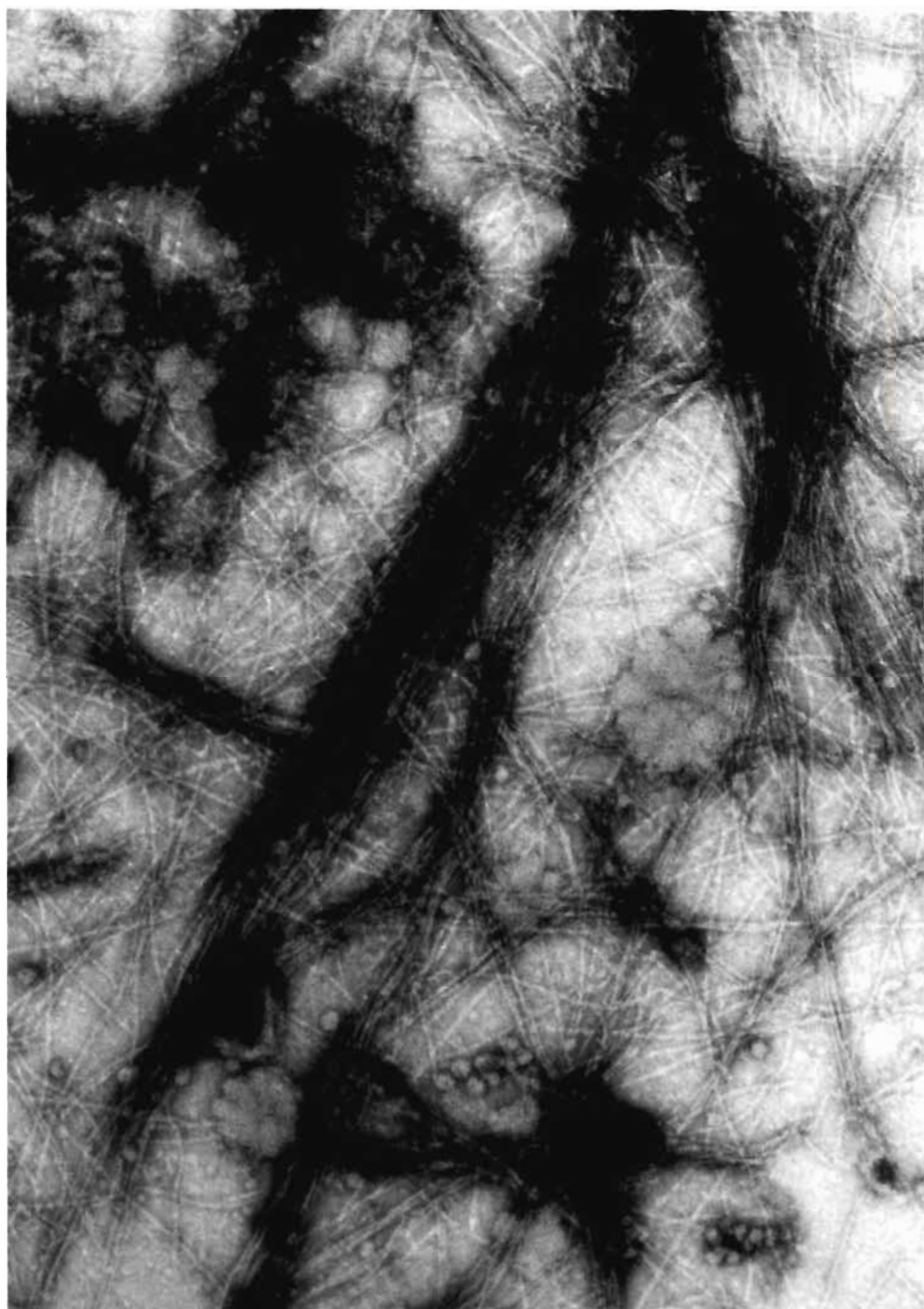
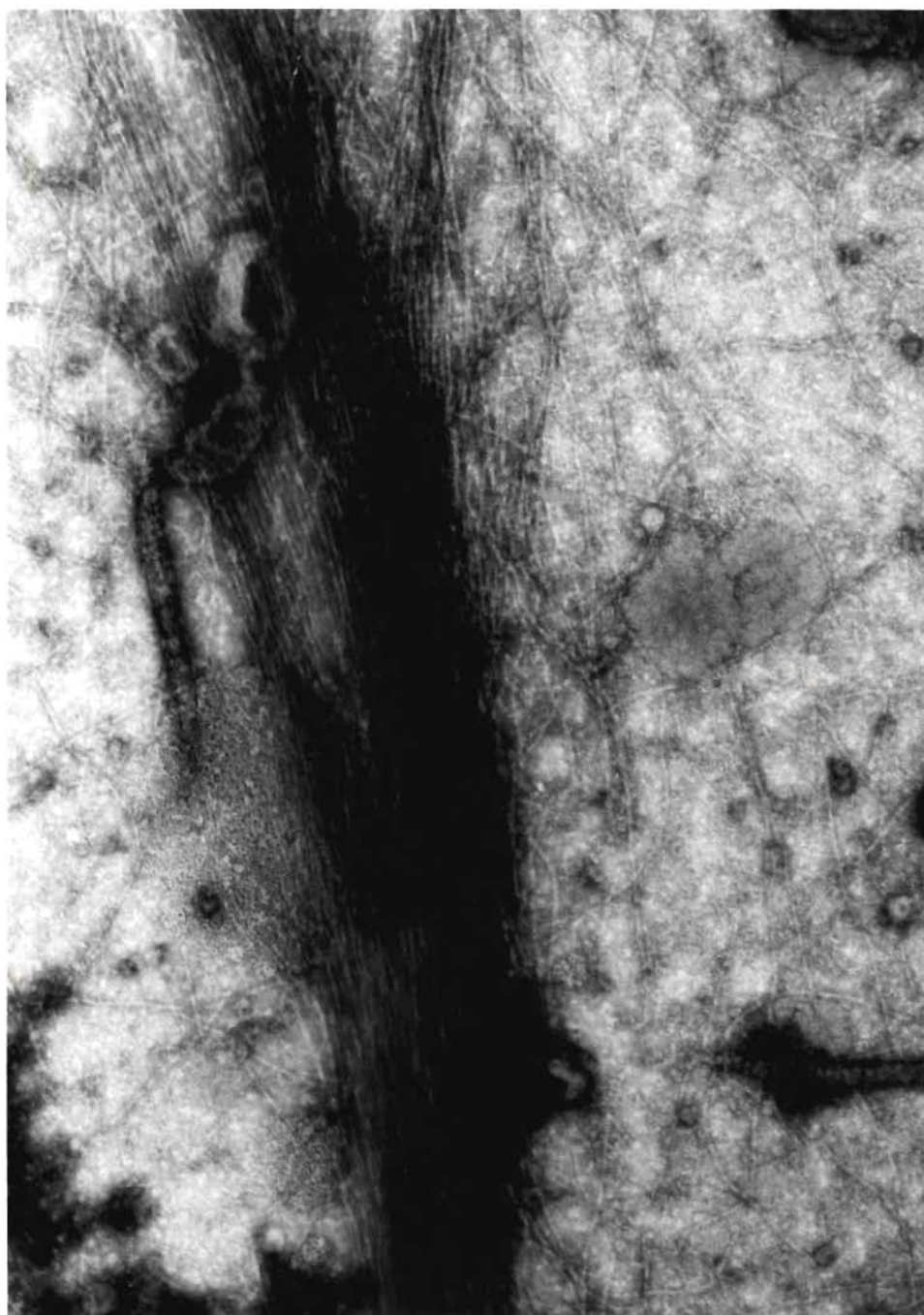


FIGURE 26 Préparation de cytoplasme démembré exposé à une concentration de 2×10^{-5} M de phalloïdine, à pH 7.2, en présence de 1mM d'ATP. Les filaments d'actine sont arrangés parallèlement en faisceaux.

—— 88 500 X

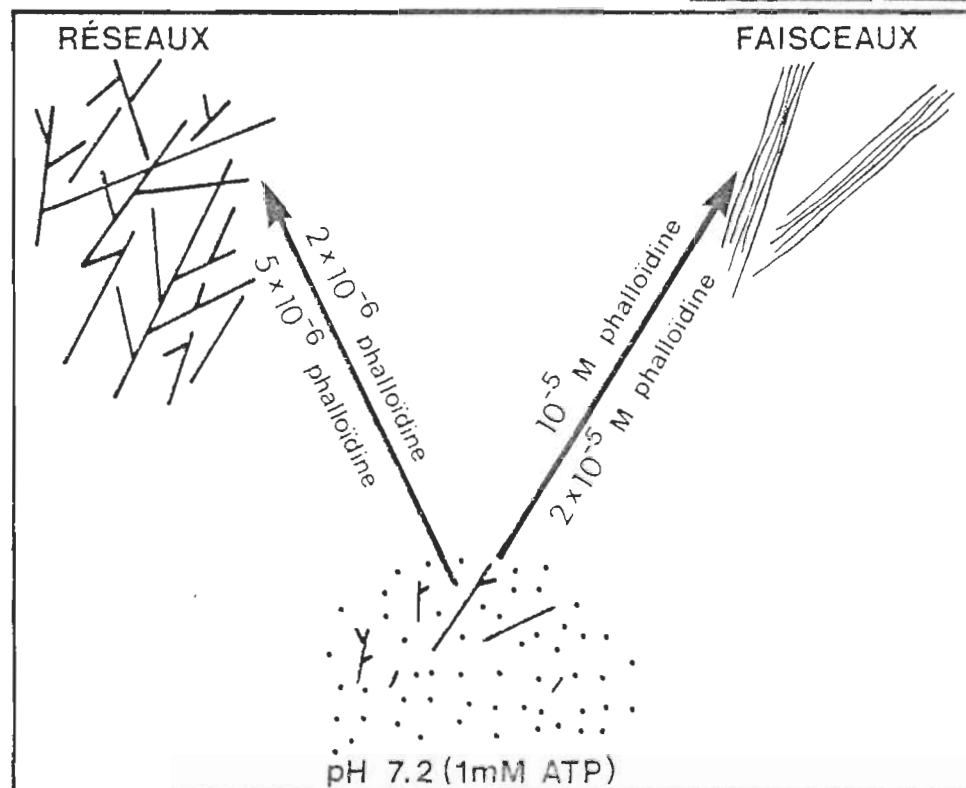


TABEAU 1 Action de la phalloïdine sur le cytoplasme d'Amoeba proteus, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP. Dans les préparations non exposées à la phalloïdine (préparations standard), les filaments d'actine sont rares et nous observons des mouvements cytoplasmiques dans ces préparations en microscopie optique. Quand le cytoplasme est exposé à une concentration de $2 \times 10^{-6} \text{M}$ ou $5 \times 10^{-6} \text{M}$, les filaments d'actine sont nombreux et s'arrangent en réseaux tridimensionnels; en microscopie optique, les mouvements cytoplasmiques sont homologues à ceux des préparations standard. A des concentrations plus élevées de toxine, 10^{-5}M et $2 \times 10^{-5} \text{M}$, les filaments d'actine sont très nombreux et sont arrangés de façon parallèle en faisceaux; on n'observe pas de mouvement cytoplasmique, en microscopie optique, dans ces préparations.

ACTION DE LA PHALLOÏDINE SUR LE CYTOPLASME D'AMOEBE PROTEUS

CONCENTRATION DE PHALLOÏDINE	$2 \times 10^{-6} M$	$5 \times 10^{-6} M$	$10^{-5} M$	$2 \times 10^{-5} M$
MICROSCOPIE OPTIQUE	MOUVEMENTS NORMAUX	MOUVEMENTS NORMAUX	SANS MOUVEMENT	SANS MOUVEMENT
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	FILAMENTS D'ACTINE RAMIFIES	RESEAUX TRIDIMENSIONNELS DE FILAMENTS D'ACTINE	AGREGATION PARALLELE DES FILAMENTS D'ACTINE: FAISCEAUX	FIBRILLES, AGREGATION PARALLELE DES FILAMENTS D'ACTINE

ACTION DE LA PHALLOÏDINE SUR L'ACTINE D'AMOEBE PROTEUS



s'écoule beaucoup plus rapidement à l'extérieur de la cellule. Les mouvements cytoplasmiques prennent place immédiatement et sont très violents. Les organismes conservent néanmoins leur aspect normal.

B- Microscopie électronique

En microscopie électronique, nous avons observé dans ces préparations, tout comme dans le cytoplasme exposé à la phalloïdine, une prolifération évidente des filaments d'actine (Figure 27). L'action de la viroïdine semble cependant plus faible que celle de la phalloïdine à la même concentration (Figure 28). Les préparations exposées à $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de viroïdine sont généralement comparables à celles réalisées en présence de $2 \times 10^{-6} \text{M}$ de phalloïdine.

Dans ces préparations, comme dans celles exposées à la phalloïdine:

- certains filaments d'actine sont ramifiés (Figure 29);
- on retrouve des filaments d'actine à proximité des débris membranaires (Figures 30a et 30b);
- on observe parfois des agrégats de matériel amorphe dans lesquels sont mêlés des filaments d'actine (Figure 31).

L'action de la viroïdine est également spécifique à l'actine. Nous n'avons remarqué aucun effet de la toxine sur les autres structures contractiles du cytoplasme d'Amoeba proteus.

6.4 Décoration des filaments d'actine à la méromyosine lourde (HMM)

FIGURE 27 Préparation de cytoplasme démembré exposé à une concentration de 5×10^{-6} M de viro^usine, à pH 7.2, en présence de 1mM d'ATP, à faible grossissement.
—— 38 500 X

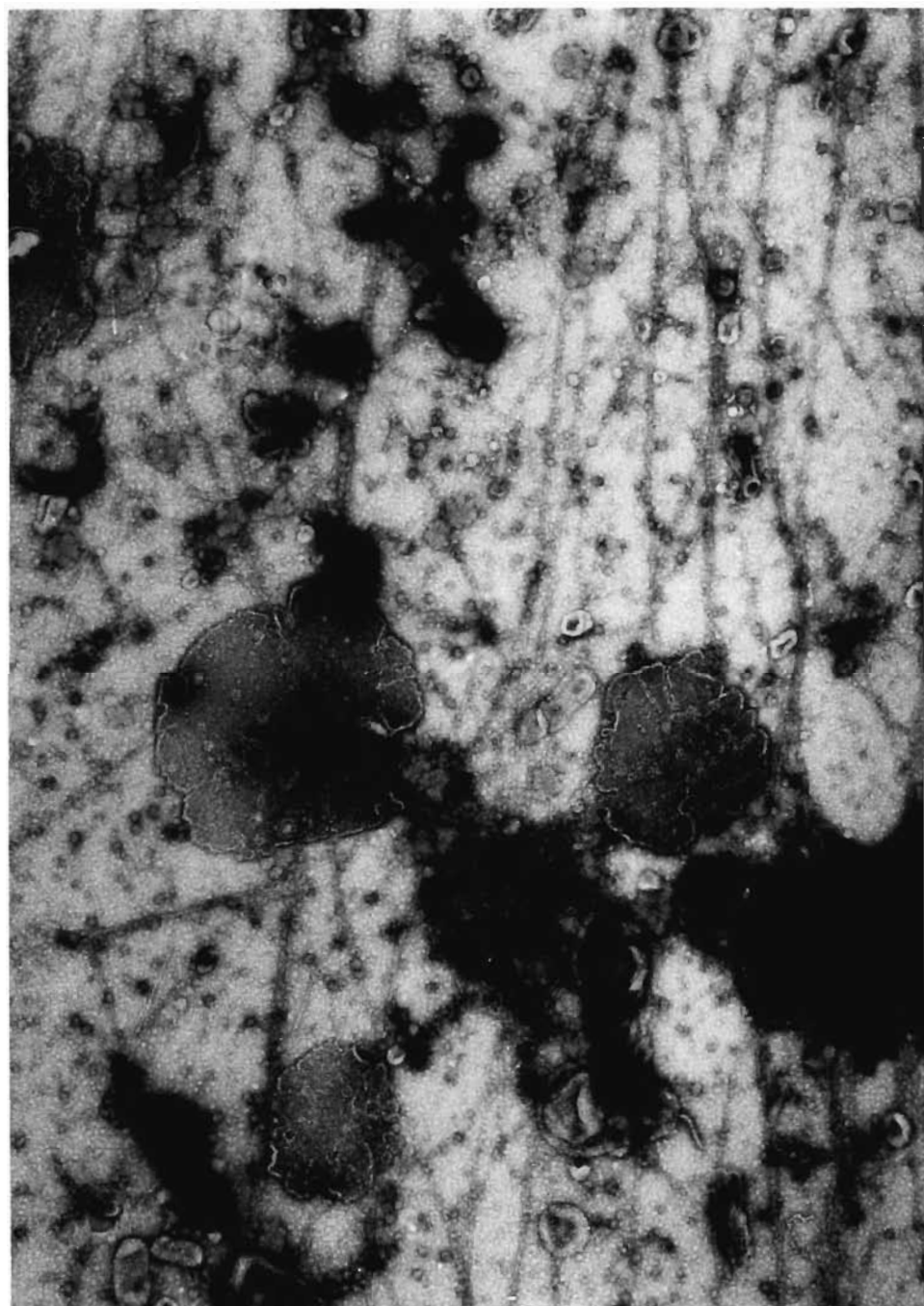


FIGURE 28 Préparation de cytoplasme démembré exposé à une concentration de 5×10^{-6} M de viroisine, à pH 7.2, en présence de 1mM d'ATP.

—— 88 500 X

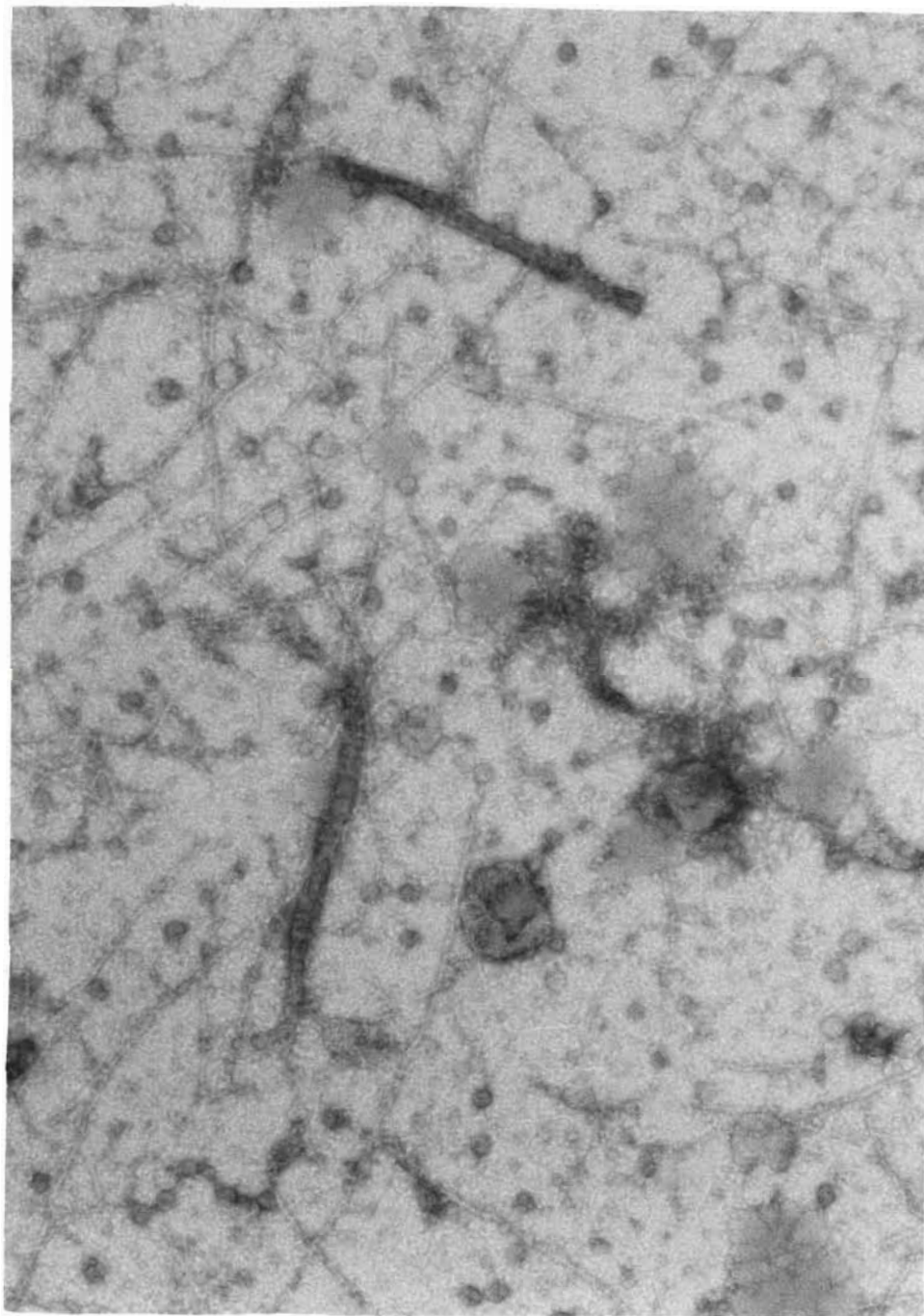
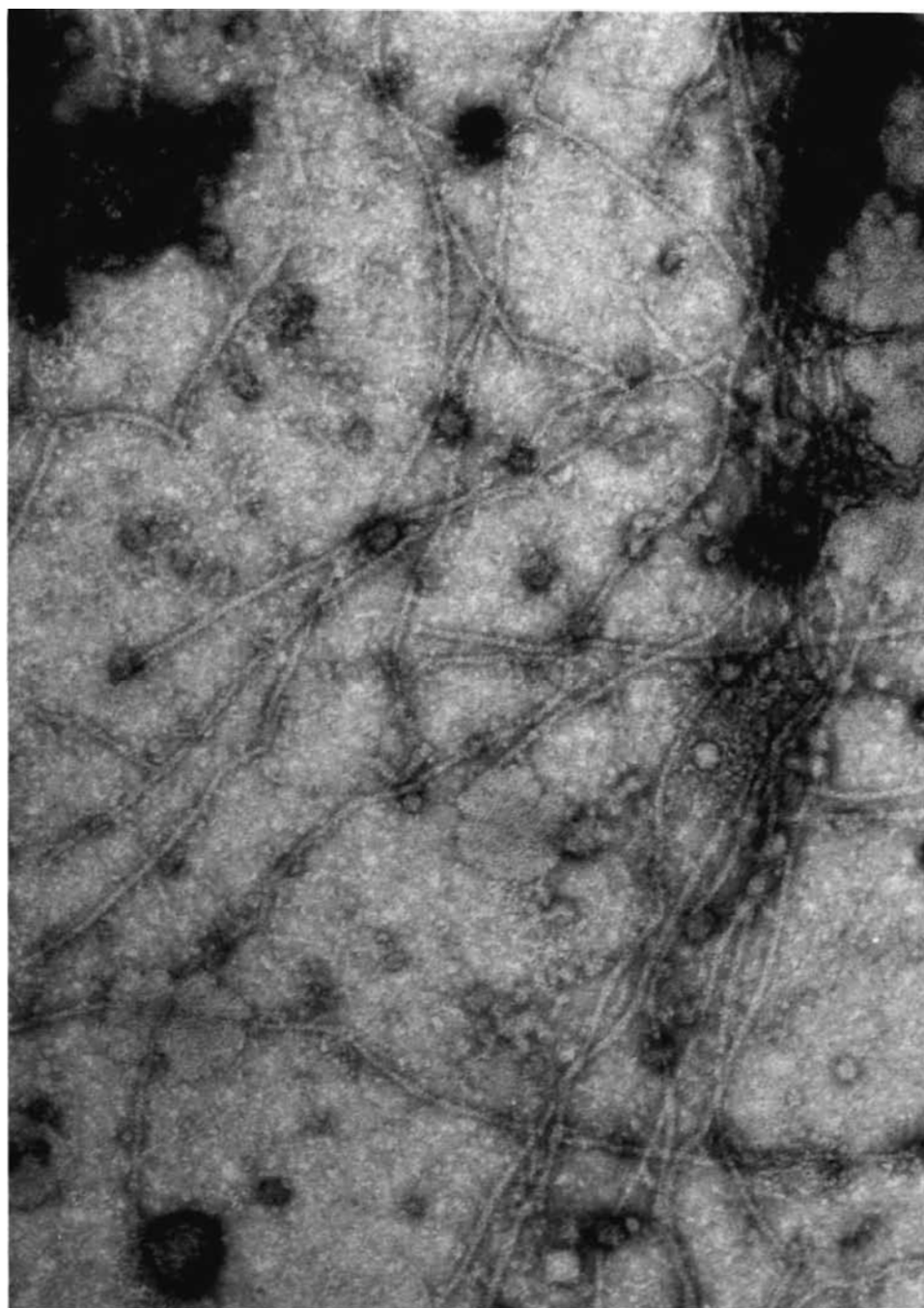


FIGURE 29 Filaments d'actine ramifiés observés dans une préparation exposée à 5×10^{-6} M de viroïdine, à pH 7.2, en présence de 1mM d'ATP.

—— 131 000 X



FIGURES 30a, 30b

Filaments d'actine à proximité de débris membranaires observés dans une préparation exposée à $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de viroïdine, à pH 7.2, en présence de 1mM d'ATP.

—— a (photo du haut), 28 000 X; —— b (photo du bas), 63 500 X

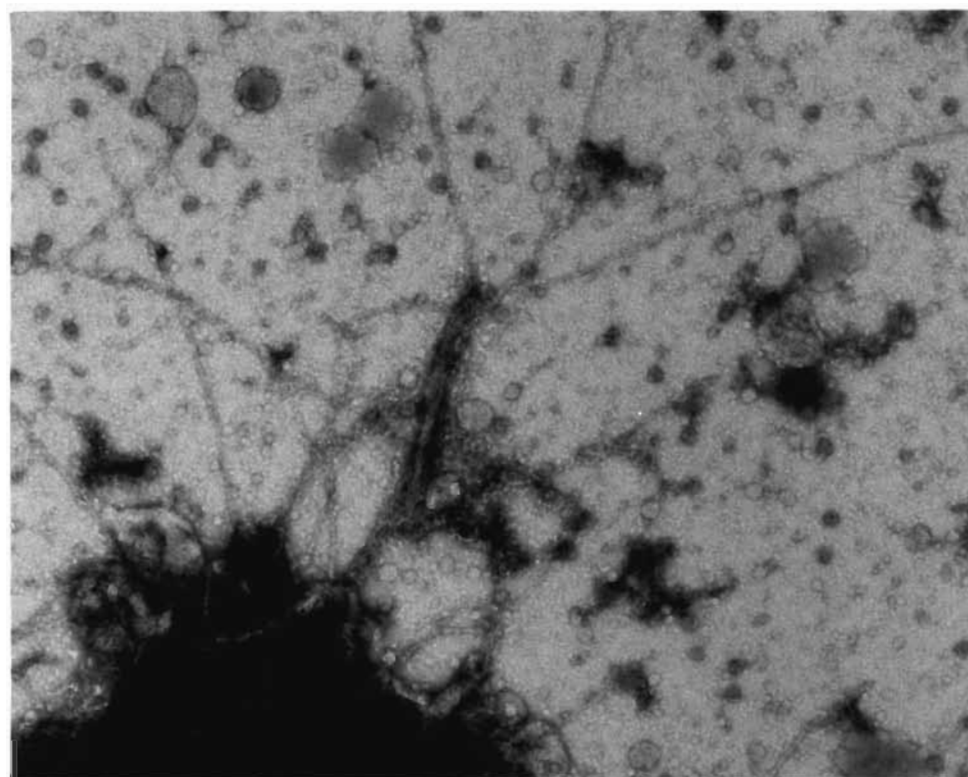
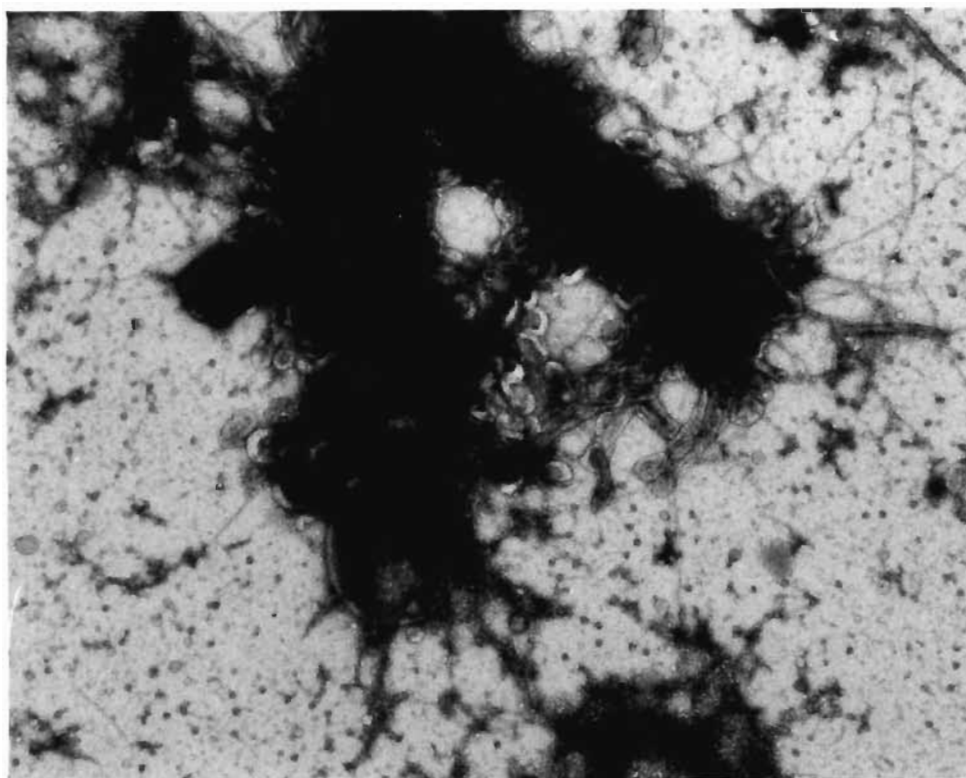
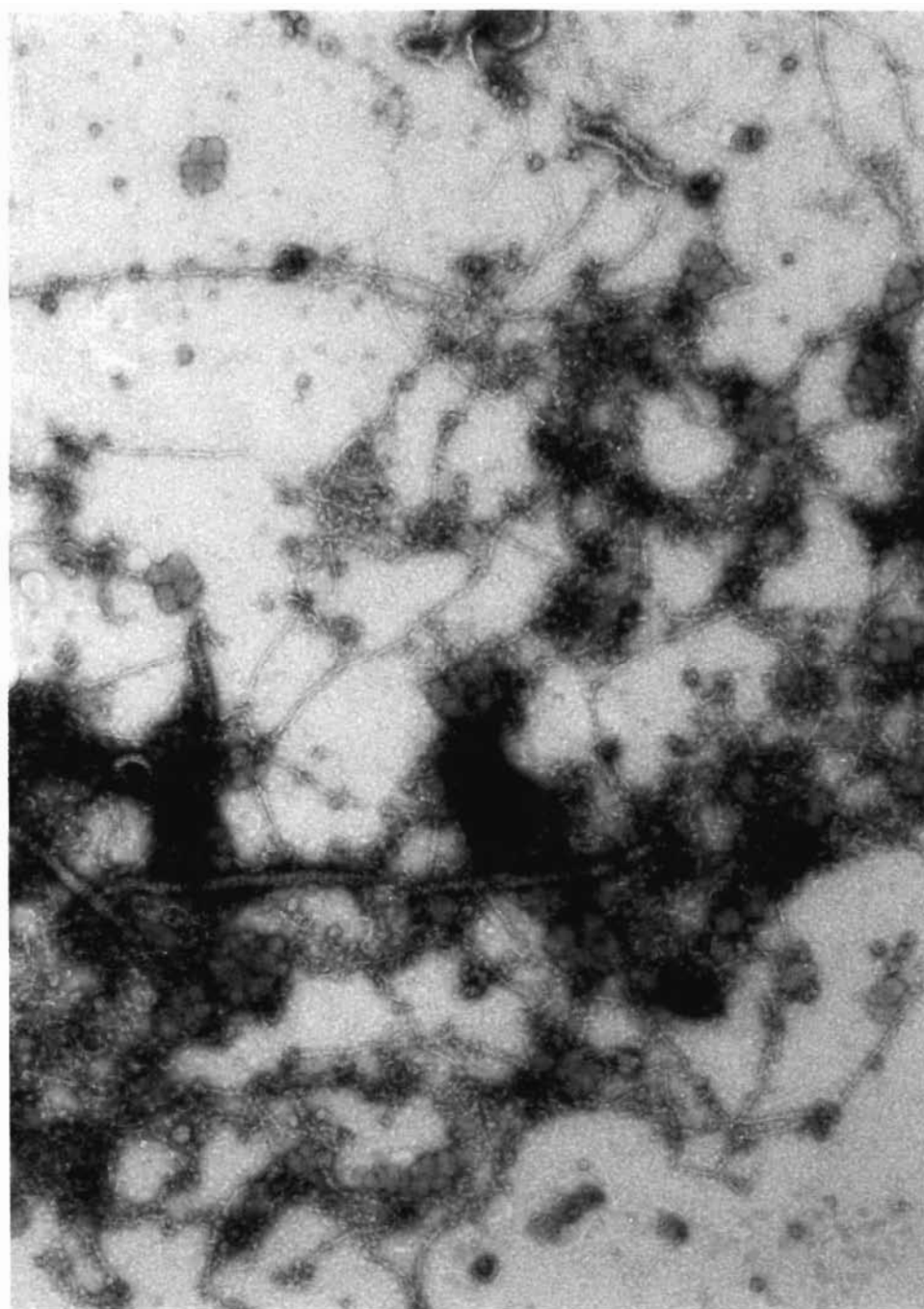


FIGURE 31 Filaments d'actine enchevêtrés dans des agrégats de matériel amorphe, observés dans une préparation exposée à 5×10^{-6} M de viroïsine, à pH 7.2, en présence de 1mM d'ATP.

—— 58 000 X



La décoration à l'HMM est une technique abondamment utilisée pour identifier spécifiquement l'actine dans les cellules non musculaires. Elle peut également servir à déterminer la polarité des filaments d'actine.

La décoration à l'HMM se fait en absence d'ATP. Nous avons donc vérifié, en un premier temps, l'effet de la suppression de l'ATP dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970) à pH 7.2, sur le cytoplasme démembrané d'Amoeba proteus:

- en microscopie optique, le cytoplasme démembrané à pH 7.2 sans ATP exogène montre des mouvements qualitativement homologues à ceux des préparations standard (pH 7.2, 1mM d'ATP);
- en microscopie électronique, l'aspect de ces préparations est le même que celui des préparations standard .

Nous avons alors traité à l'HMM:

- 1- le cytoplasme démembrané dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970), sans ATP;
- le cytoplasme démembrané dans ce milieu sans ATP mais contenant $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de phalloïdine;
- 3- le cytoplasme démembrané dans ce milieu sans ATP mais contenant $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de viroïdine.

L'observation de ces préparations en microscopie électronique a montré que:

- 1- dans le cytoplasme démembré sans ATP, dans les conditions standard , l'HMM induit la polymérisation de l'actine et décore ainsi de nombreux filaments d'actine;
- 2- dans le cytoplasme démembré exposé à $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ de phalloïdine ou à $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ de viroïsine, la décoration à l'HMM n'est pas modifiée par ces deux toxines;
- 3- ces diverses préparations ont toutes le même aspect et on ne peut donc les distinguer les unes des autres après traitement à l'HMM.

La Figure 32 montre l'aspect typique de ces préparations traitées à l'HMM, à faible grossissement. Nous y avons observé à la fois des filaments d'actine ramifiés et des filaments accolés à des débris membranaires. Nous avons pu établir la polarité de ces filaments. Ainsi, dans le cas des filaments ramifiés, les Y sont formés par l'interaction de deux filaments. Le plus long filament, que nous appellerons filament principal, montre une seule polarité sur toute sa longueur. Le second filament, plus court, constitue une ramification. En général (75% des observations où cette polarité est évidente), les têtes de flèches du second filament pointent vers son point d'attachement sur le filament principal (Figure 33). Quant aux filaments à proximité des membranes, les résultats sont équivoques : on observe autant de filaments dont la polarité est orientée vers ces débris que de filaments dont la polarité s'éloigne de ces structures membranaires

FIGURE 32 Aspect typique d'une préparation traitée à l'HMM, à faible grossissement.

— 20 500 X

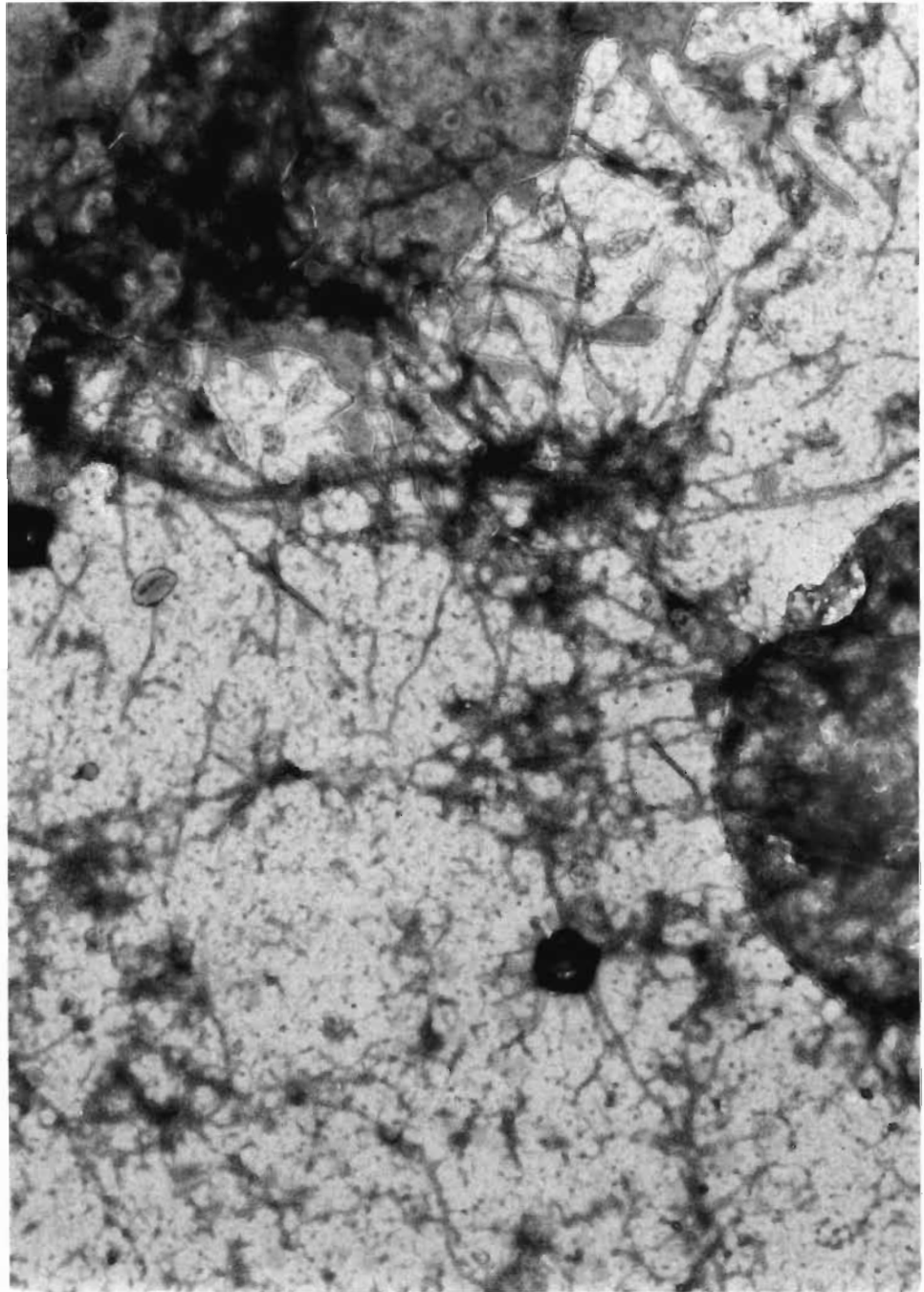
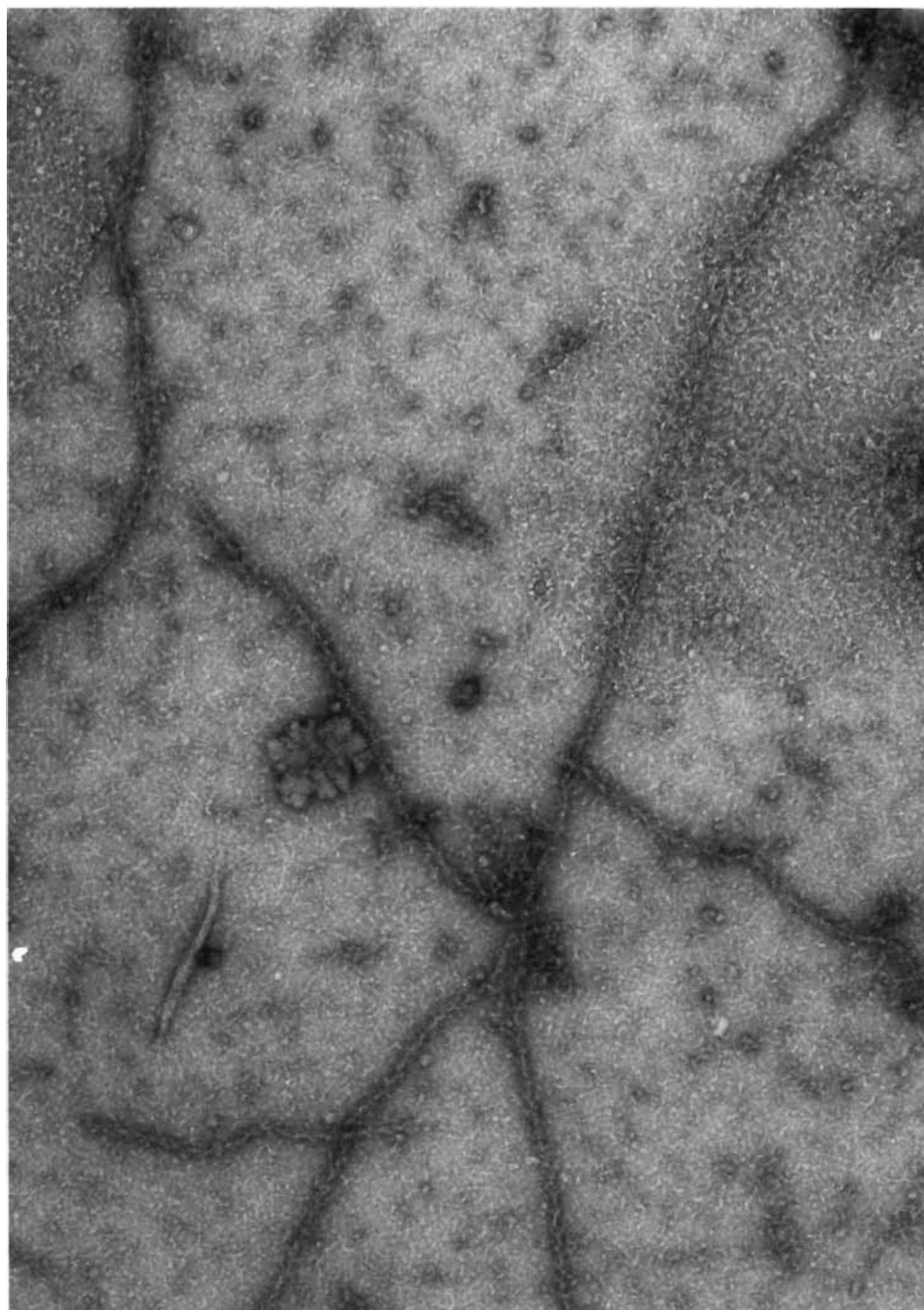


FIGURE 33 Polarité des filaments d'actine ramifiés, décorés à l'HMM.

— 58 000 X



(Figure 34). Nous ne pouvons donc pas établir si ces filaments sont attachés aux débris membranaires.

Dans les préparations traitées à l'HMM, nous n'avons pas observé de filaments intermédiaires. Les filaments de myosine y sont également rares. Nous y avons noté d'autre part la présence de nouvelles structures: elles ont la forme de gros bâtons (60 à 300nm de diamètre) de longueur variable et elles semblent interagir avec les filaments d'actine (Figures 35a,35b). Quelques micrographies laissent croire que ces "bâtons" puissent être constitués de filaments de myosine agrégés côte-à-côte et/ou bout-à-bout (Figure 36).

6.5 Effet d'une variation de pH sur le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus*

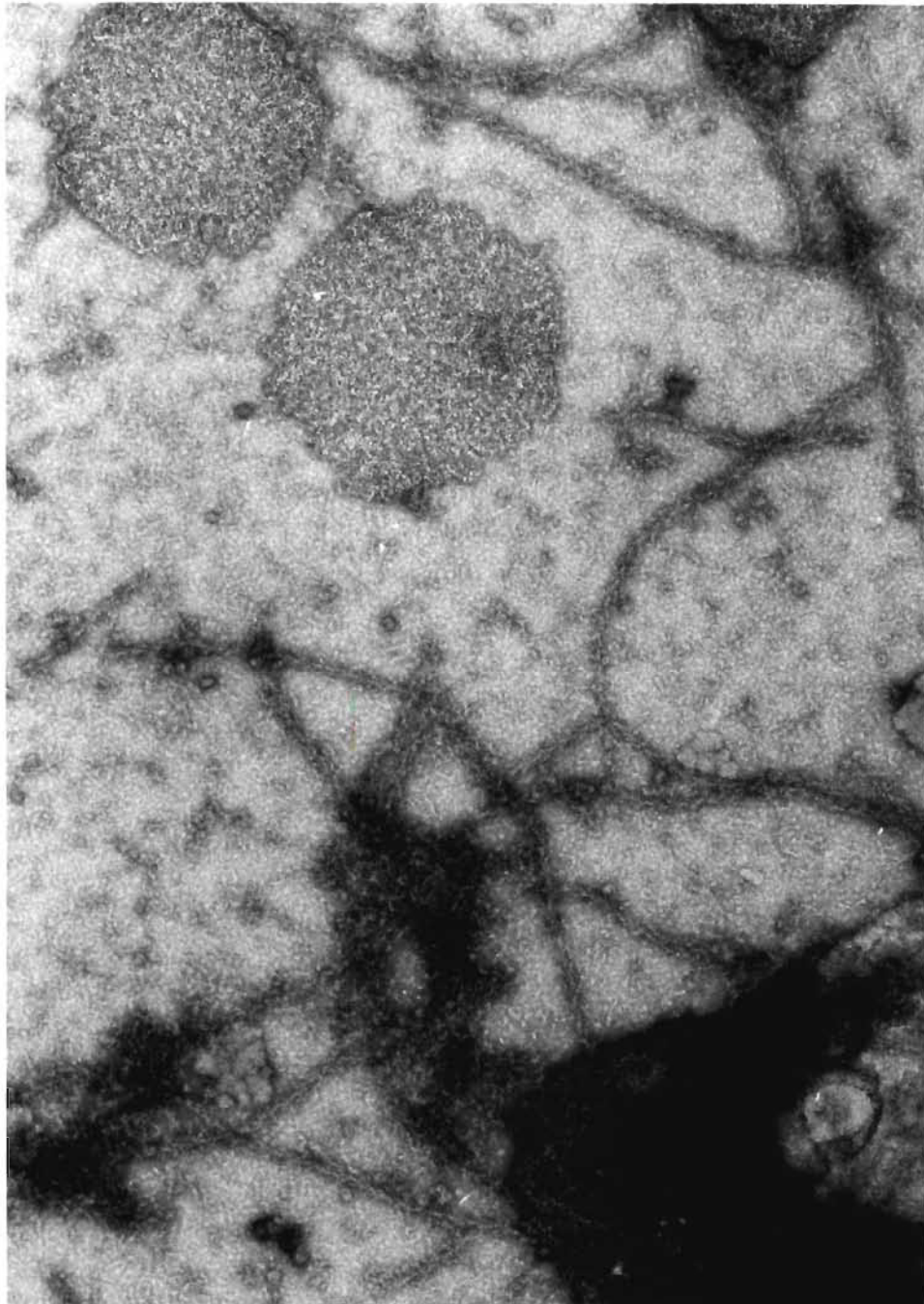
Nous avons préparé du cytoplasme démembré dans le milieu de Gicquaud et Couillard ajusté à différents pH ,de 5.0 à 9.0, en présence de 1mM d'ATP.

A- Microscopie optique

A des pH inférieurs à 6.2, le cytoplasme démembré est dépourvu de mouvement. A pH 6.2, les mouvements cytoplasmiques sont, au contraire, très violents. Ces mouvements ralentissent progressivement aux pH 6.6 et 7.0. A des pH plus élevés, 7.4, 7.8 et 8.2, les cellules deviennent difficiles à briser et les mouvements cytoplasmiques sont de plus en plus lents. A pH 8.2, on n'observe que très peu de mouvement. Au-delà de pH 8.2, on arrive difficilement à rompre les membranes cellulaires et, quand on y parvient,

FIGURE 34 Polarité de filaments d'actine à proximité de débris membranaires, décorés à l'HMM.

—— 58 000 X



FIGURES 35a, 35b

Structures en bâtons de diamètre et longueur variables observées dans les préparations traitées à l'HMM. Ces structures semblent parfois interagir avec les filaments d'actine.

—— a (photo du haut), 14 500 X; —— b (photo du bas), 41 600 X

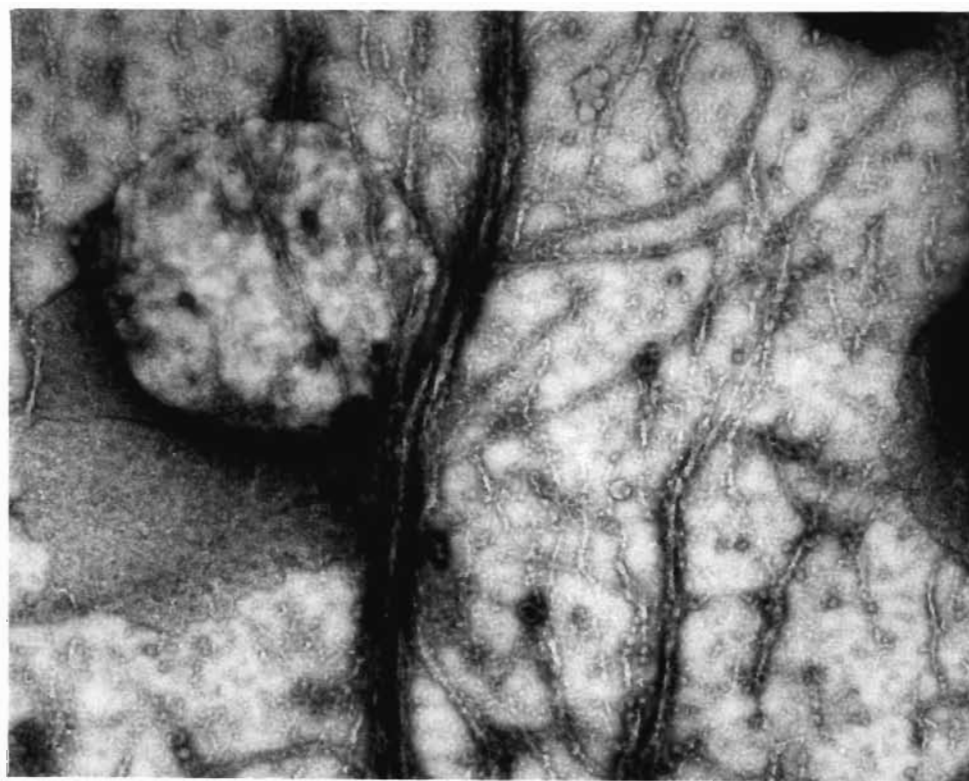
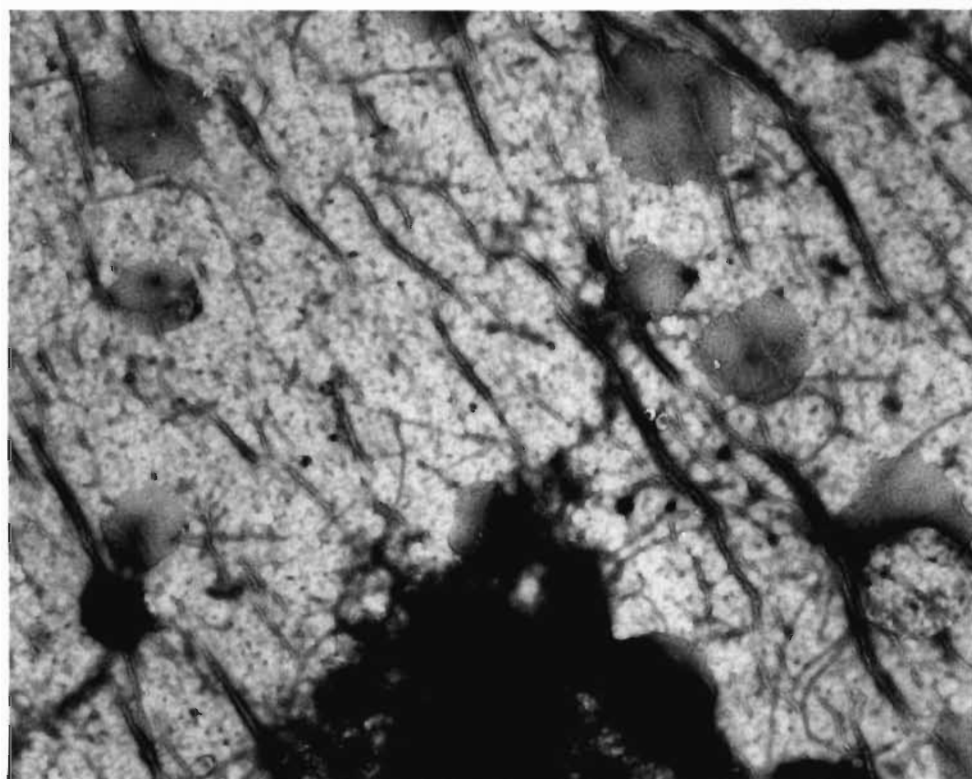
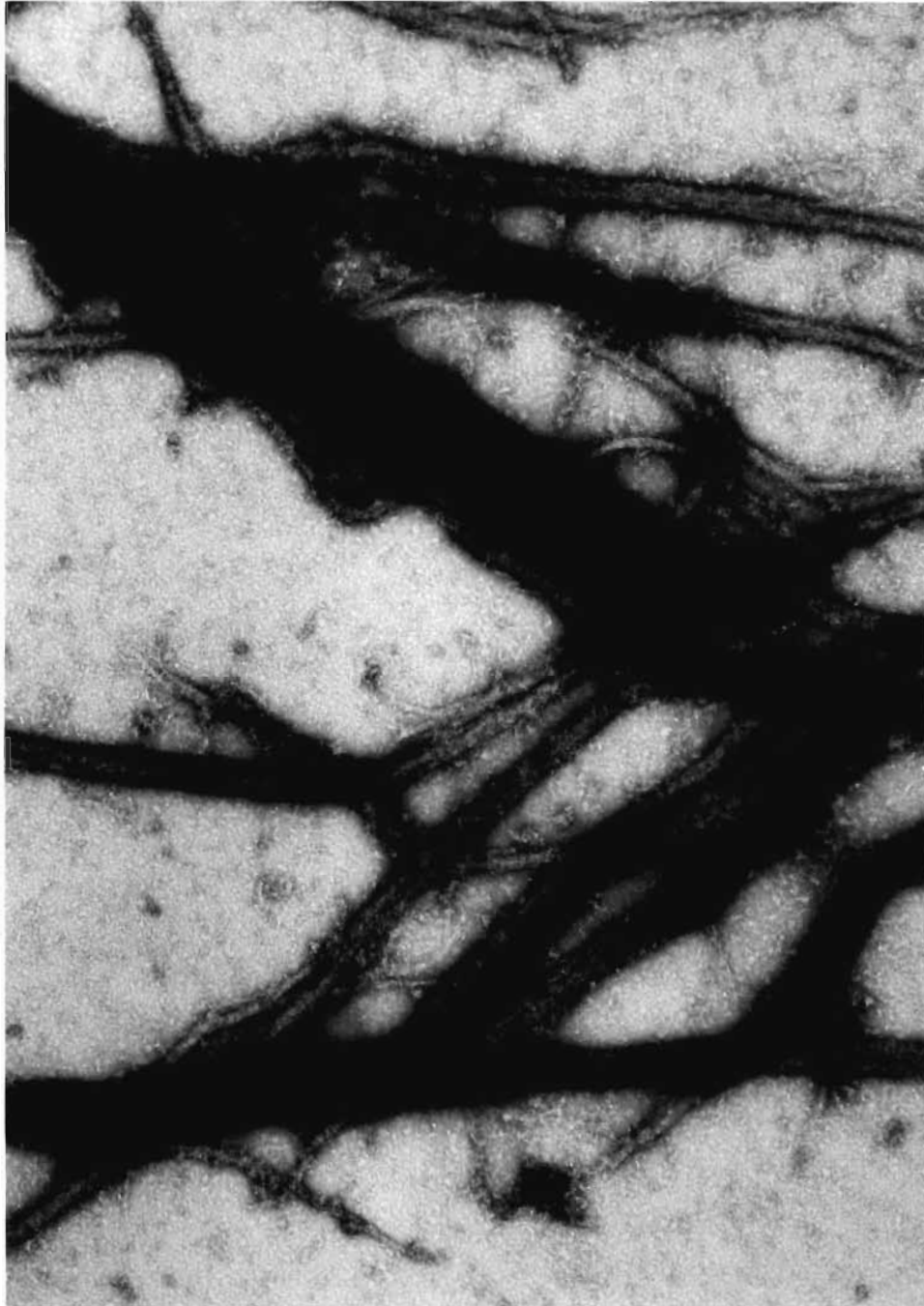


FIGURE 36 Structures en bâtons observées dans les préparations traitées à l'HMM. Ici, ces "bâtons" semblent constitués de filaments de myosine agrégés côte-à-côte et/ou bout-à-bout.

—— 58 000 X



on n'observe plus de mouvement.

B- Microscopie électronique

Lors de l'observation de ces diverses préparations en microscopie électronique, nous avons noté:

- qu'à des pH inférieurs à 6.2, le matériel contractile n'est pas bien conservé; les filaments d'actine sont courts et les filaments de myosine sont mal colorés; seuls les filaments intermédiaires semblent résister à l'action de ces pH .
- qu'à pH 6.2, les filaments d'actine sont très nombreux et tendent à former des réseaux tridimensionnels. Ces réseaux sont fréquemment associés à des agrégats de matériel amorphe (Figures 37a, 37b).

Nous avons relevé, à plusieurs reprises, la présence de petits filaments de 3 à 4 nm et filaments de taille intermédiaire à l'intérieur de ces réseaux (Figure 38). Nous n'y avons toutefois observé que très rarement des filaments de myosine: ils sont généralement associés à un autre type de réseaux de filaments d'actine que nous qualifierons de réseaux libres (Figure 39).

- qu'aux pH 6.6 et 7.0, les filaments d'actine deviennent progressivement plus rares et, par conséquent, l'arrangement en réseaux est de moins en moins fréquent. A pH 7.0, les préparations ont l'aspect des préparations standard réalisées à pH 7.2 en présence d'ATP.

FIGURES 37a, 37b

Préparations de cytoplasme démembré réalisées à pH 6.2, en présence de 1mM d'ATP. Les filaments d'actine sont nombreux et arrangés en réseaux tridimensionnels. — a (photo du haut), 63 500 X; — b (photo du bas), 63 500 X

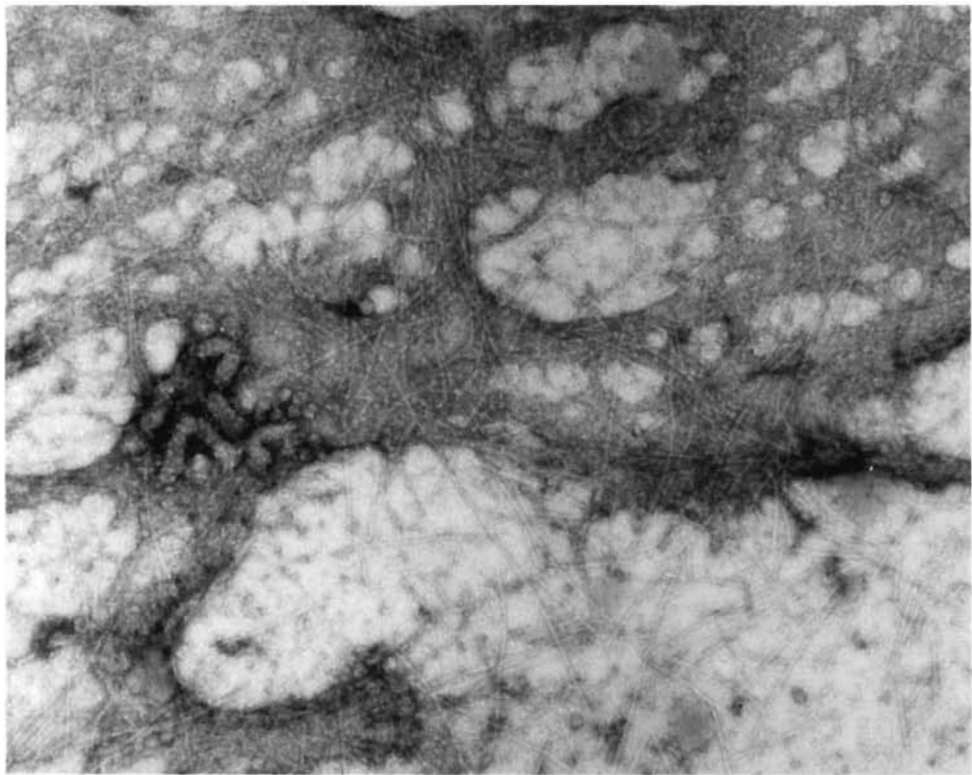
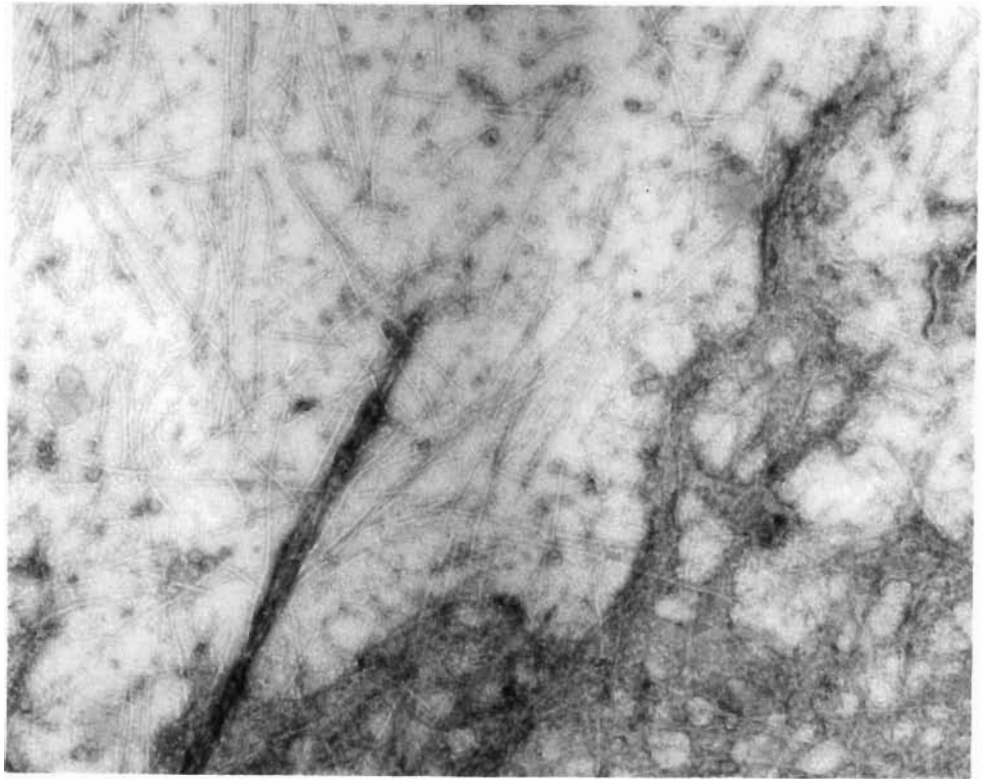


FIGURE 38 Présence de filaments de taille intermédiaire et de
petits filaments de 3 à 4 nm à l'intérieur des réseaux
d'actine observés à pH 6.2, en présence de 1mM d'ATP.
—— 88 500 X

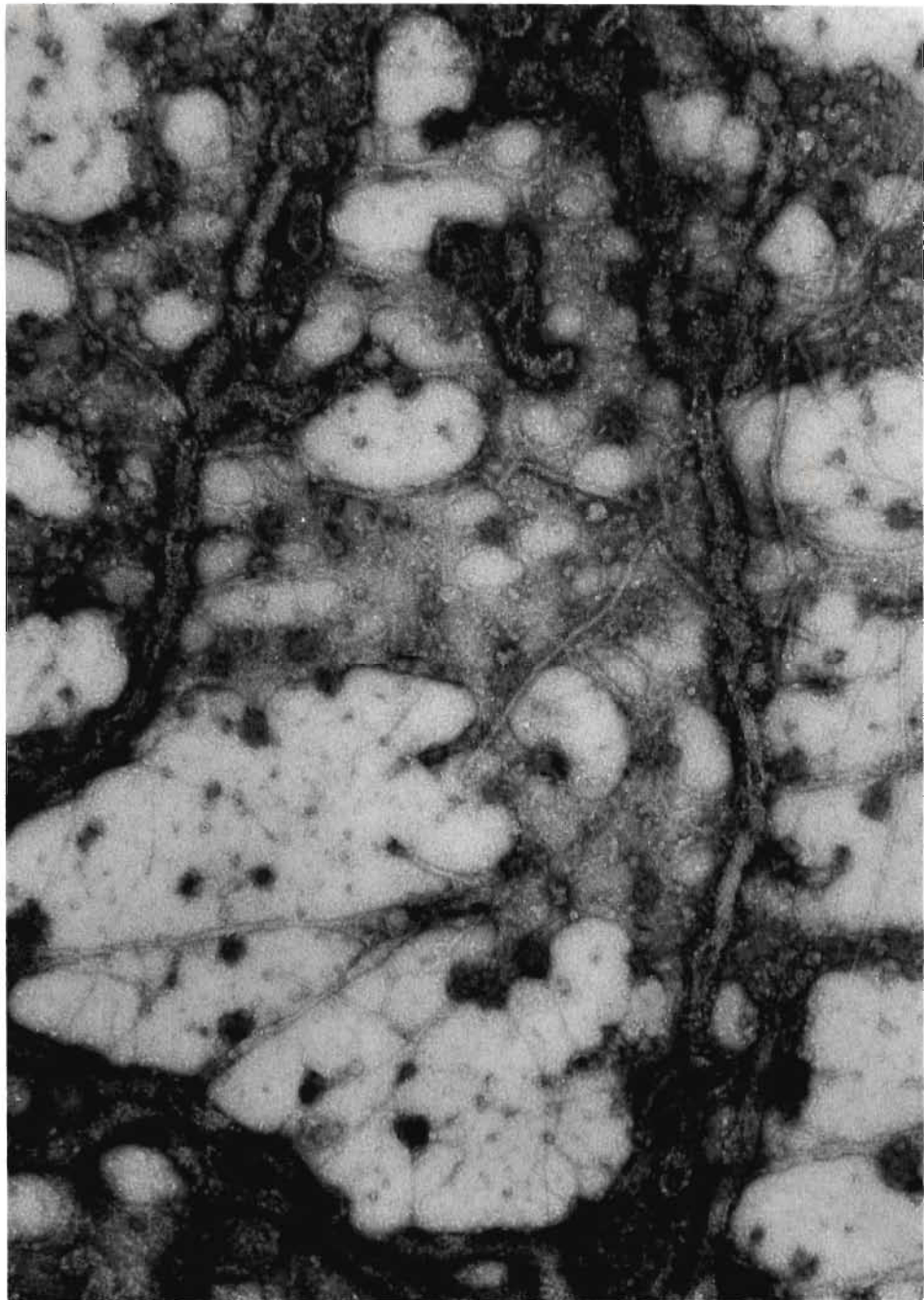
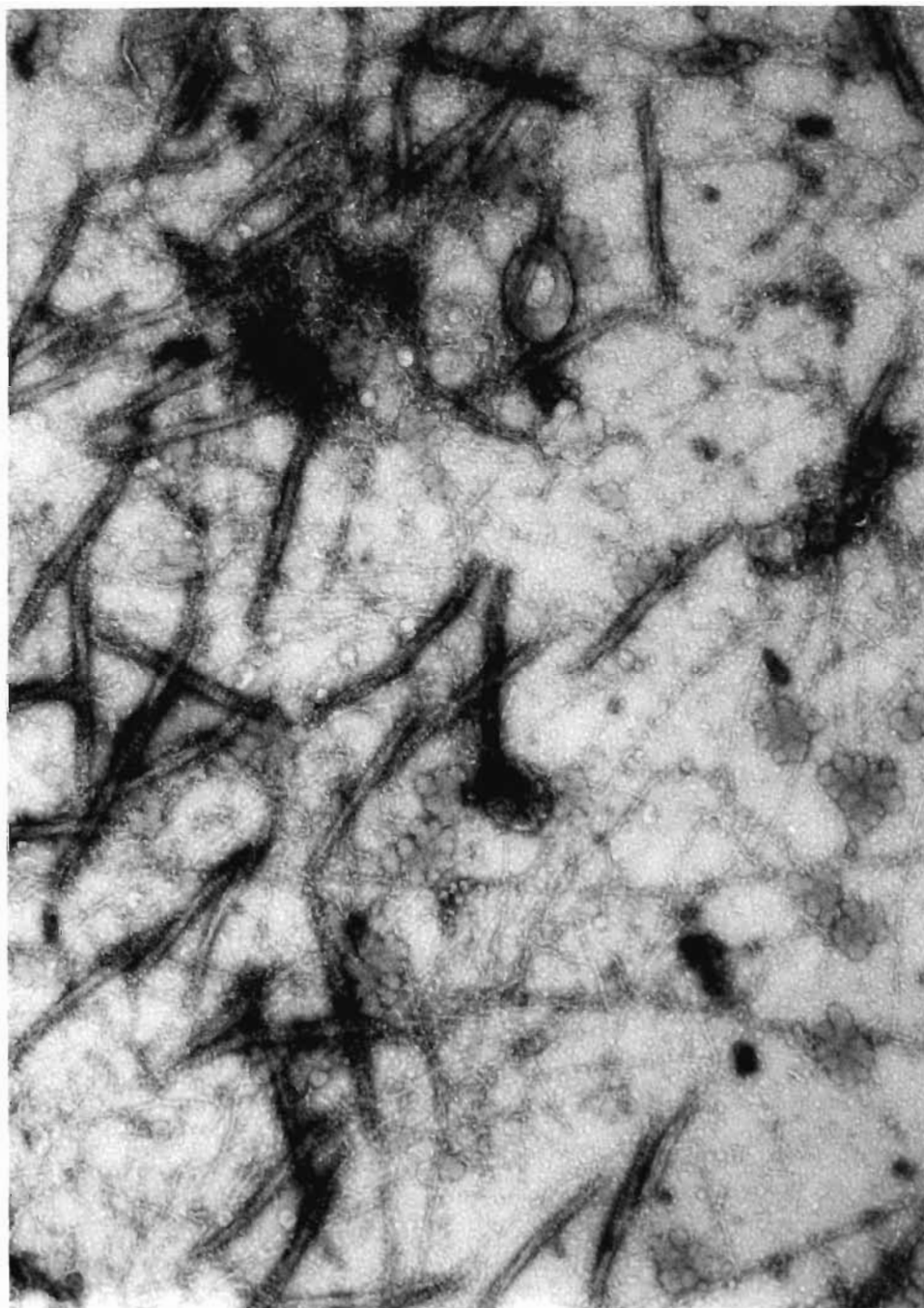


FIGURE 39 Filaments de myosine observés dans les préparations de cytoplasme démembrané réalisé à pH 6.2, en présence de 1mM d'ATP; réseaux "libres" de filaments d'actine.

—— 58 000 X



- qu'à des pH supérieurs à 7.2 - 7.4, 7.8 et 8.2 - les filaments d'actine redeviennent plus nombreux et s'arrangent principalement en faisceaux de filaments parallèles (Figure 40). On n'observe que quelques rares réseaux tridimensionnels d'actine dans ces préparations. L'arrangement parallèle des filaments d'actine s'accroît de 7.4 à 8.2.

A pH 8.2, nous avons observé à plusieurs reprises, un grand nombre de particules globulaires à proximité de filaments intermédiaires (Figure 41). Ces particules ne semblent pas arrangées de façon aléatoire: elles sont souvent alignées.

- qu'à des pH supérieurs à 8.2, les filaments d'actine et de myosine sont mal préservés alors que les filaments intermédiaires conservent leur aspect habituel.

Nos observations nous permettent donc de conclure que le pH influence l'état de polymérisation de l'actine dans le cytoplasme d'Amoeba proteus. Le Tableau 2 résume l'influence d'une variation de pH sur le cytoplasme démembré en présence de 1mM d'ATP.

6.6 Effet de l'ATP sur le cytoplasme d'Amoeba proteus

Nous avons étudié l'influence de l'ATP sur le cytoplasme d'Amoeba proteus à différents pH, c'est-à-dire à pH 6.2, 7.2 et 8.2. Dans certaines préparations, nous avons utilisé le 2,4-dinitrophénol, agent découplant de la phosphorylation oxydative, afin de diminuer la concentration d'ATP endogène.

FIGURES 40a, 40b

Préparations de cytoplasme démembrané réalisées à pH 8.2, en présence de 1mM d'ATP. Les filaments d'actine sont nombreux et s'arrangent parallèlement.

—— a (photo du haut), 63 500 X; —— b (photo du bas), 63 500 X

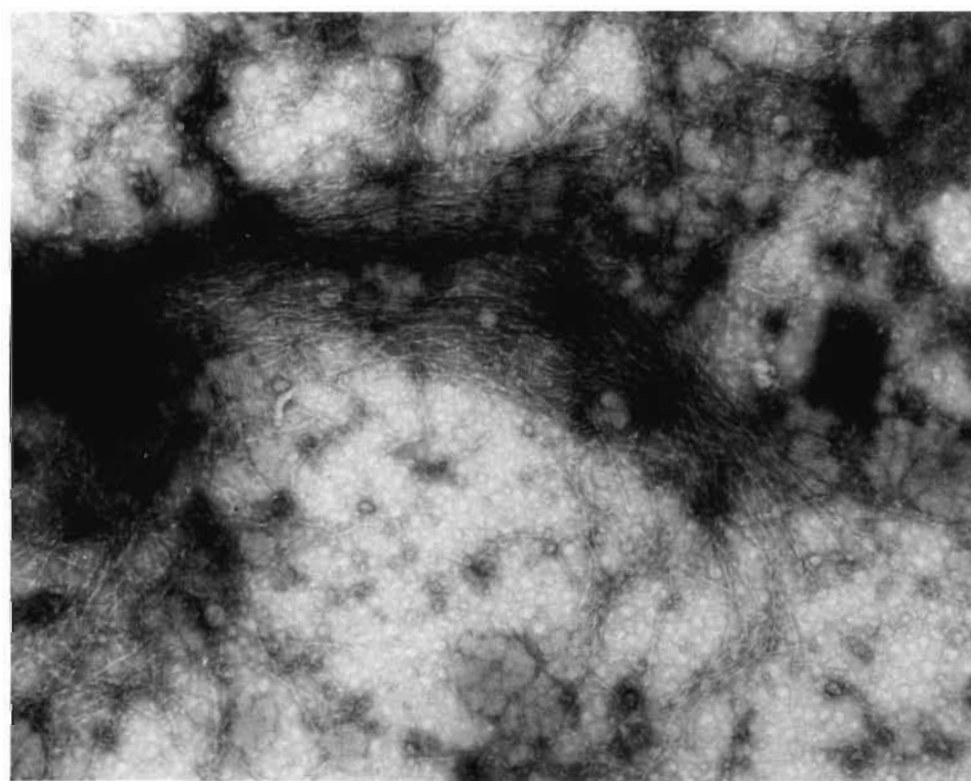
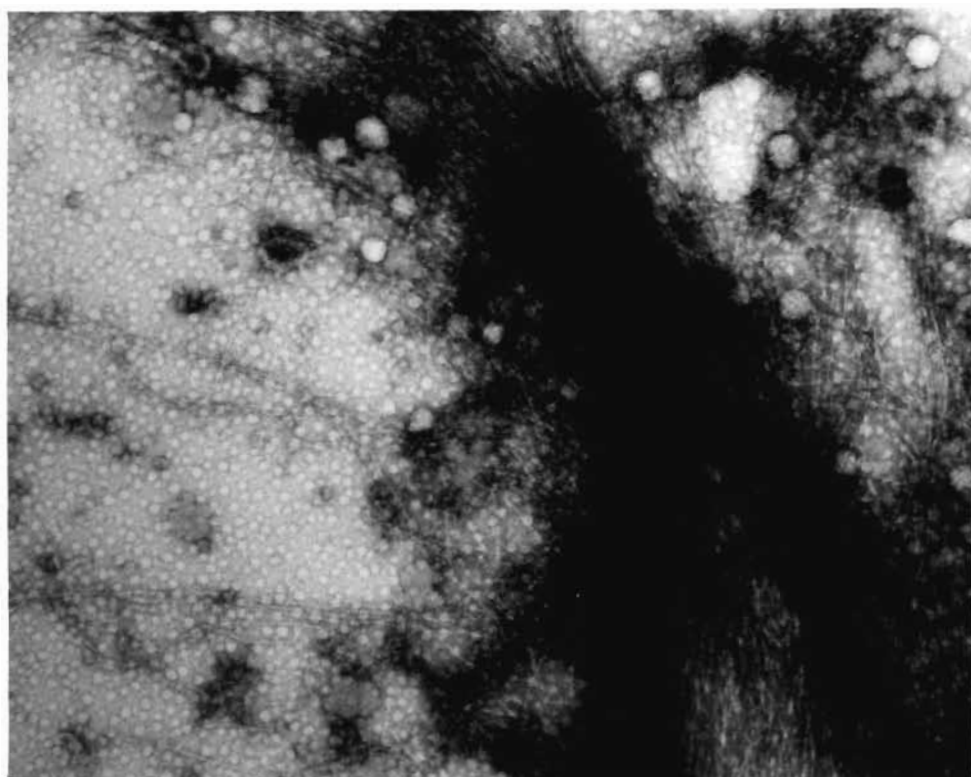


FIGURE 41 Filament intermédiaire entouré d'un grand nombre de particules globulaires, observé à pH 8.2, en présence de 1mM d'ATP. Ces particules sont souvent alignées.
—— 131 000 X

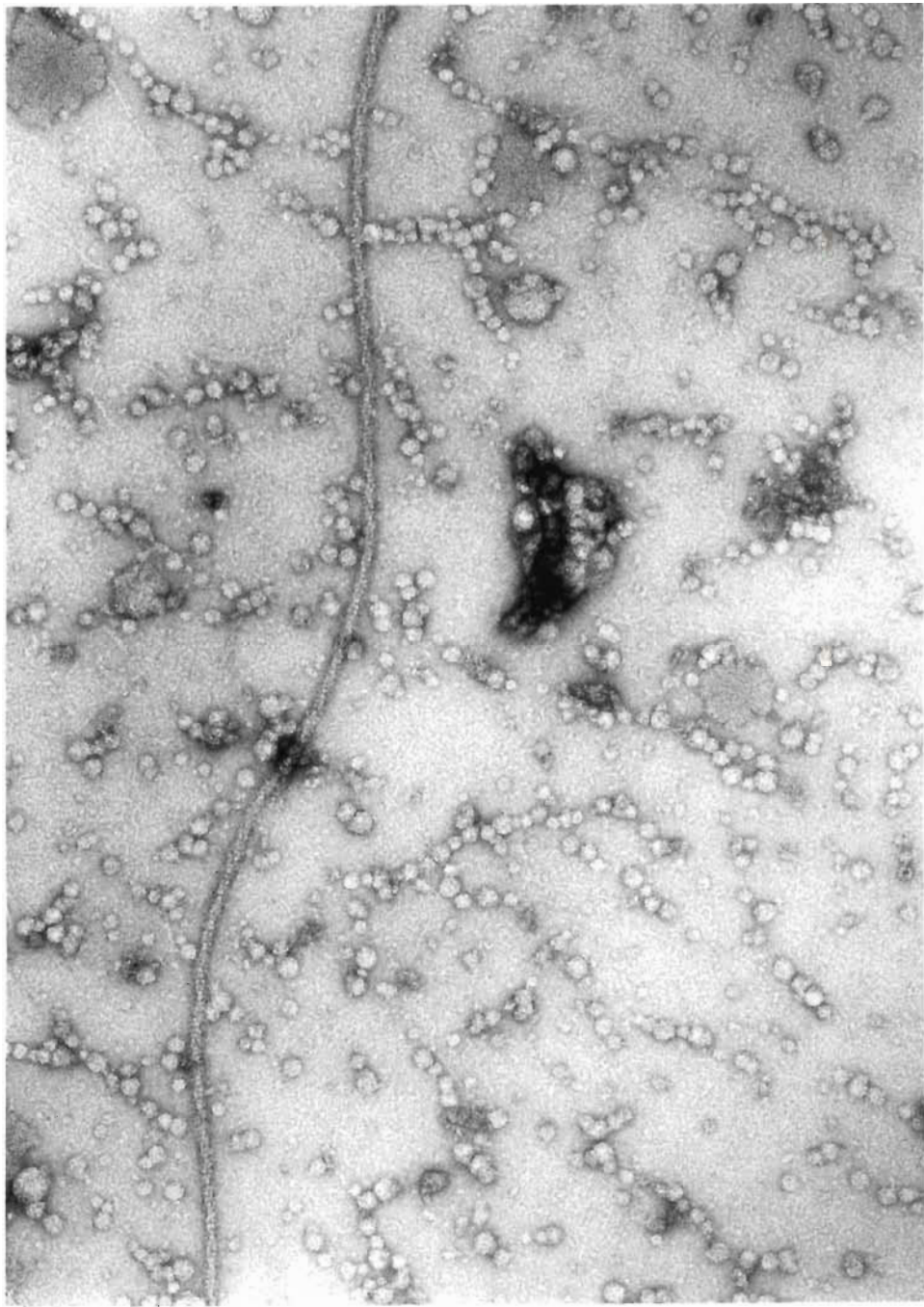
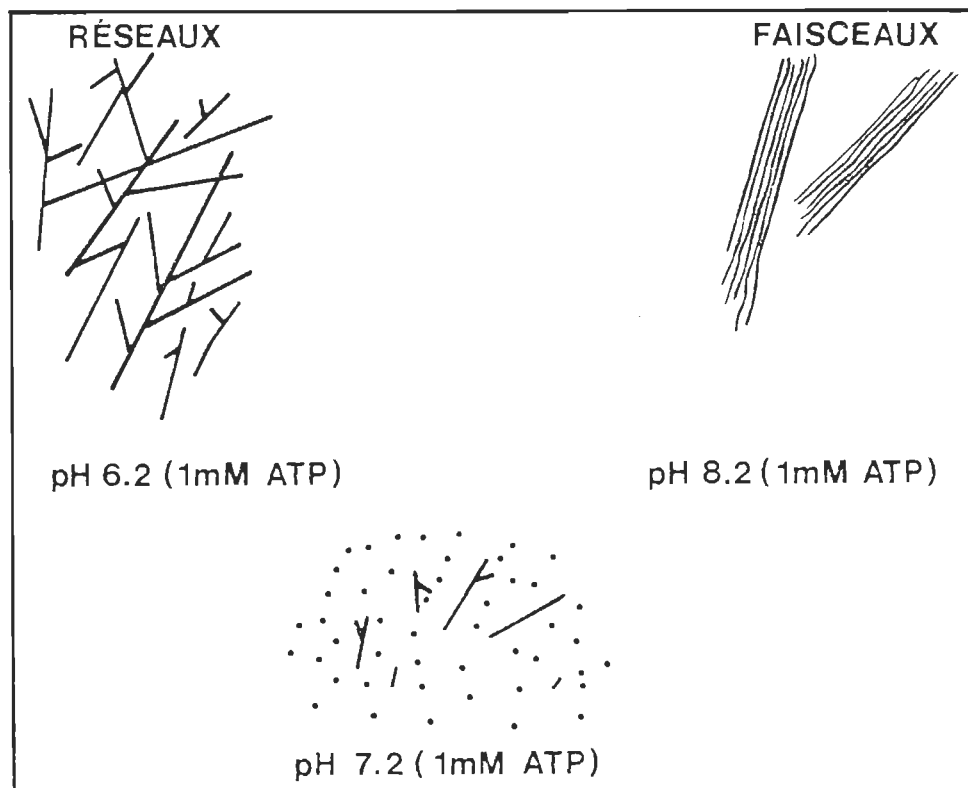


TABLEAU 2 Influence d'une variation de pH sur le cytoplasme d'Amoeba proteus en présence de 1mM d'ATP. A pH 7.2, comme dans les préparations standard , les filaments d'actine sont rares et nous observons des mouvements dans ces préparations en microscopie optique. Quand le cytoplasme est préparé à pH 6.2, les filaments d'actine sont nombreux et forment des réseaux tridimensionnels; l'on observe, en microscopie optique, des mouvements cytoplasmiques violents. A pH 8.2, les filaments d'actine sont également nombreux mais ils s'arrangent principalement en faisceaux de filaments parallèles; on n'observe que très peu de mouvement dans ces préparations en microscopie optique.

INFLUENCE D'UNE VARIATION DE PH SUR LE CYTOPLASME D'AMOEBA PROTEUS

pH	6.2	7.2	8.2
MICROSCOPIE OPTIQUE	MOUVEMENTS VIOLENTS	MOUVEMENTS NORMAUX	MOUVEMENTS LENTS
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	RESEAUX TRIDIMENSIONNELS DE FILAMENTS D'ACTINE	RARES FILAMENTS D'ACTINE	FAISCEAUX DE FILAMENTS PARALLELES D'ACTINE



Nous avons donc préalablement observé le "comportement motile" d'Amoeba proteus, c'est-à-dire la morphologie cellulaire et le mouvement de cette amibe, sous l'effet du 2,4-dinitrophénol 10^{-4} M afin de déterminer la période d'incubation nécessaire pour diminuer l'ATP endogène de ces cellules.

A- Effet du 2,4-dinitrophénol (DNP) sur le comportement motile d'Amoeba proteus

Quand les amibes sont exposées à une concentration 10^{-4} M de DNP, l'on observe des changements dans leur comportement motile. Ces changements sont très semblables à ceux notés par Smith et collab. (1979) dans une étude sur les effets de l'anaérobiose et des inhibiteurs métaboliques sur la motilité d'Amoeba proteus. La Figure 42 résume ces changements. Après 3 heures d'incubation, environ 60% des amibes restent fixées au substrat: elles ont cependant pris une forme allongée, monopodiale. Les autres (40%) cellules flottent dans la solution: leur forme est irrégulière. Après 10 heures d'incubation, toutes les cellules sont détachées du substrat: environ 50% des cellules ont une forme arrondie, les autres ont conservé une forme irrégulière. De plus 80% de ces cellules, incubées 10 heures, montrent des changements cytoplasmiques importants: le cytoplasme s'agrège en une masse dense pour ne plus occuper qu'une petite région de la cellule.

Il devient impossible de briser les amibes entre lame et lamelle après une incubation de plus de 3 heures dans le DNP, 10^{-4} M. Les effets du DNP, d'autre part, n'étant pas évidents avant cette période d'incubation,

FIGURE 42 Représentation schématique des changements dans le comportement motile d'Amoeba proteus sous l'effet du 2,4-dinitrophénol: 0 heure, cellules témoins; 3 à 10 heures d'incubation, 60% des cellules restent ancrées au substrat et ont une forme allongée monopodiale, 40% des cellules flottent dans le milieu et ont une forme irrégulière; après 10 heures d'incubation, toutes les cellules sont détachées du substrat: elles ont une forme arrondie ou irrégulière et 80% de ces cellules montrent des changements cytoplasmiques importants.

INFLUENCE DU 2,4-DINITROPHENOL, 10^{-4} M, SUR LE COMPORTEMENT
MOTILE D'AMOEBA PROTEUS


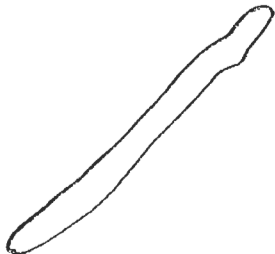
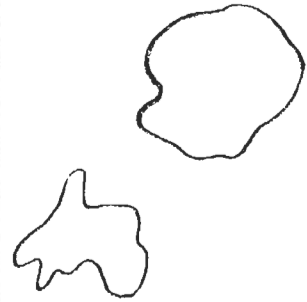
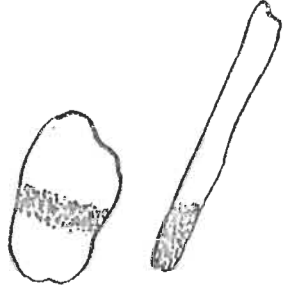
Temps d'incubation au DNP	0 heure	3 à 10 heures	10 heures et plus
Amibes attachées au substrat			
Amibes qui flot- tent dans le mi- lieu			

FIGURE 42

nous avons alors brisé les cellules au potter pour étudier l'influence de la concentration d'ATP sur les structures contractiles d'*Amoeba proteus*. Nous n'avons donc pas pu observer les mouvements cytoplasmiques de ces préparations en microscopie optique.

B- Influence de l'ATP sur des préparations de cytoplasme réalisées aux pH 6.2, 7.2 et 8.2

Nous avons préparé du cytoplasme démembrané aux pH 6.2, 7.2 et 8.2:

- 1- sans ATP: les cellules sont préincubées 3 heures dans 10^{-4} M DNP et brisées dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970) dépourvu d'ATP.
- 2- sans ATP exogène:
les cellules sont brisées dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970) dépourvu d'ATP.
- 3- avec ATP: le cytoplasme est préparé dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970), c'est-à-dire en présence de 1mM ATP.
- 4- avec ATP exogène:
les cellules sont préincubées 3 heures dans 10^{-4} M DNP et brisées dans le milieu de Gicquaud et Couillard (1970) en présence de 1mM ATP.

I- Influence de l'ATP sur des préparations à pH 6.2

A pH 6.2, l'absence d'ATP (dans le cytoplasme des cellules préincubées au DNP) ou de faibles concentrations d'ATP (dans le cytoplasme des cellules brisées sans ATP exogène) favorisent l'arrangement parallèle des filaments d'actine: l'on observe de nombreux faisceaux dans les préparations sans ATP (Figures 43a, 43b) et de petits agrégats dans le cytoplasme préparé sans ATP exogène (Figures 44a, 44b). Le cytoplasme préparé sans ATP exogène montre très peu de mouvements en microscopie optique.

Quand le cytoplasme est préparé en présence de 1mM d'ATP exogène (ce-la correspond aux préparations précédemment décrites au sous-chapitre 6.5, Figures 37a et 37b), les filaments d'actine sont arrangés en réseaux tridimensionnels et l'on observe des mouvements violents, en microscopie optique.

Dans le cytoplasme de cellules préincubées dans 10^{-4} M DNP durant 3 heures mais que l'on a brisées en présence de 1mM d'ATP exogène, les filaments sont arrangés de façon parallèle soit en faisceaux ou encore en petits agrégats (Figures 45a, 45b).

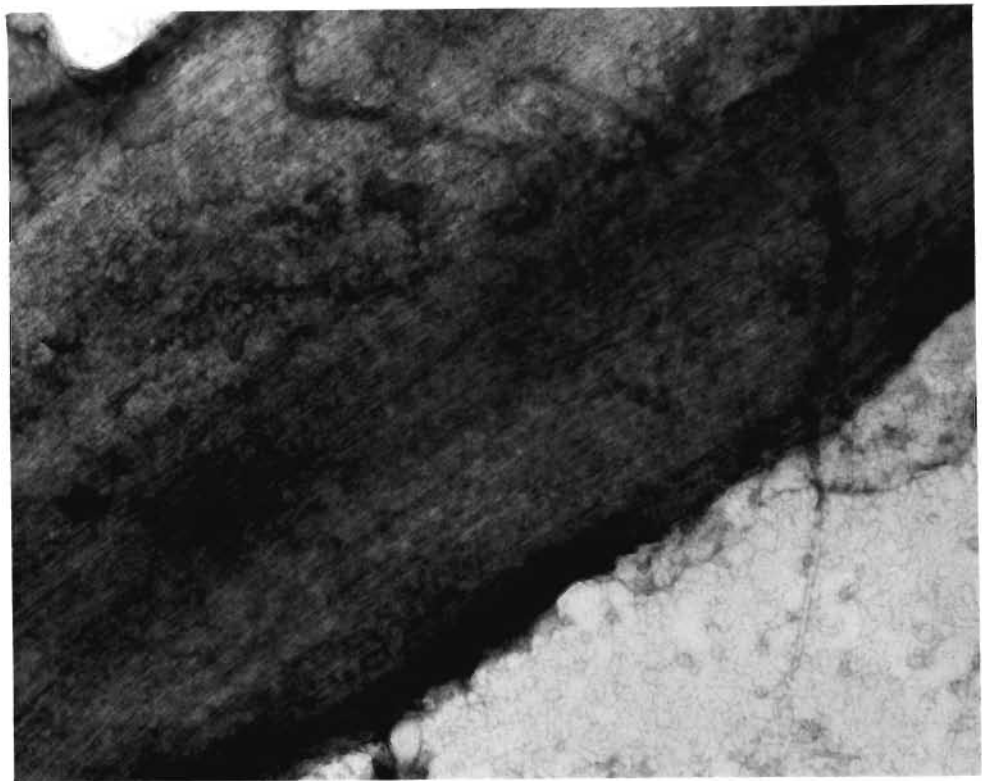
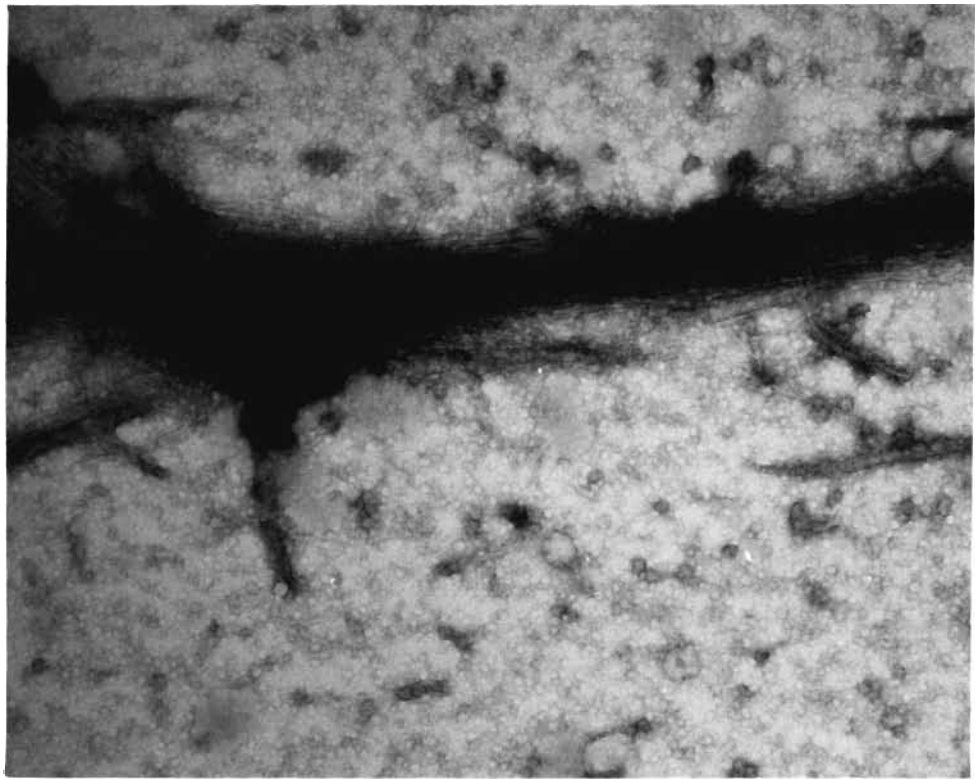
A pH 6.2, nous n'avons noté aucun effet de l'ATP sur les filaments de myosine et les filaments de taille intermédiaire: ils conservent leur morphologie habituelle.

II- Influence de l'ATP sur des préparations à pH 7.2

Nous n'avons noté aucun effet de l'ATP sur le cytoplasme préparé à pH 7.2. L'aspect de ces préparations demeure celui que nous avons décrit au

FIGURES 43a, 43b

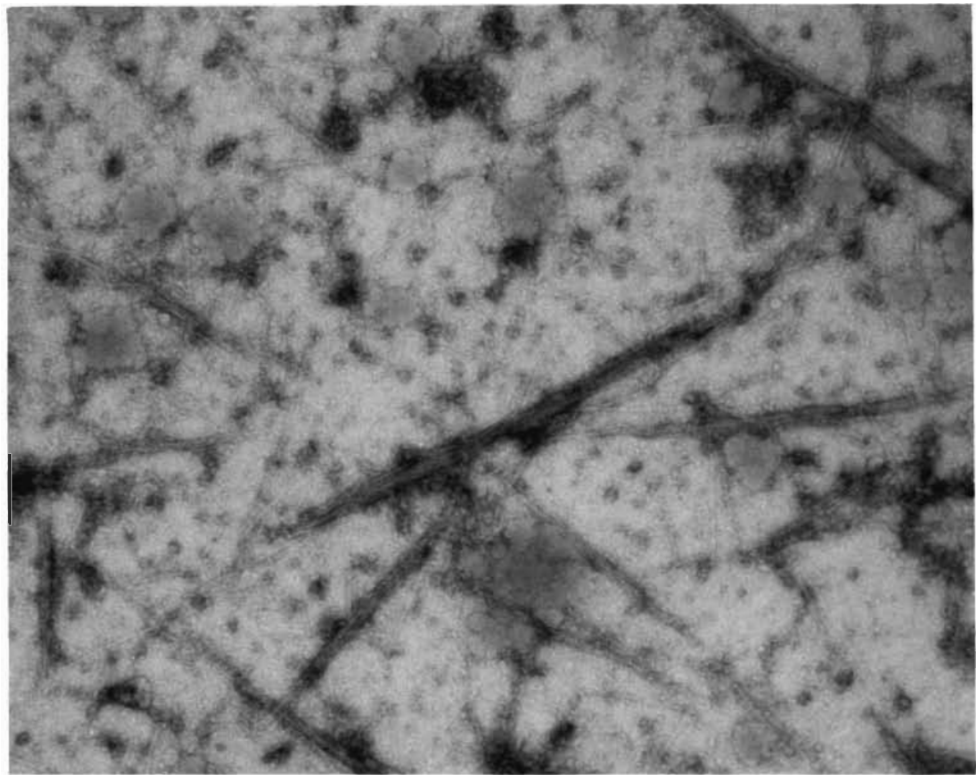
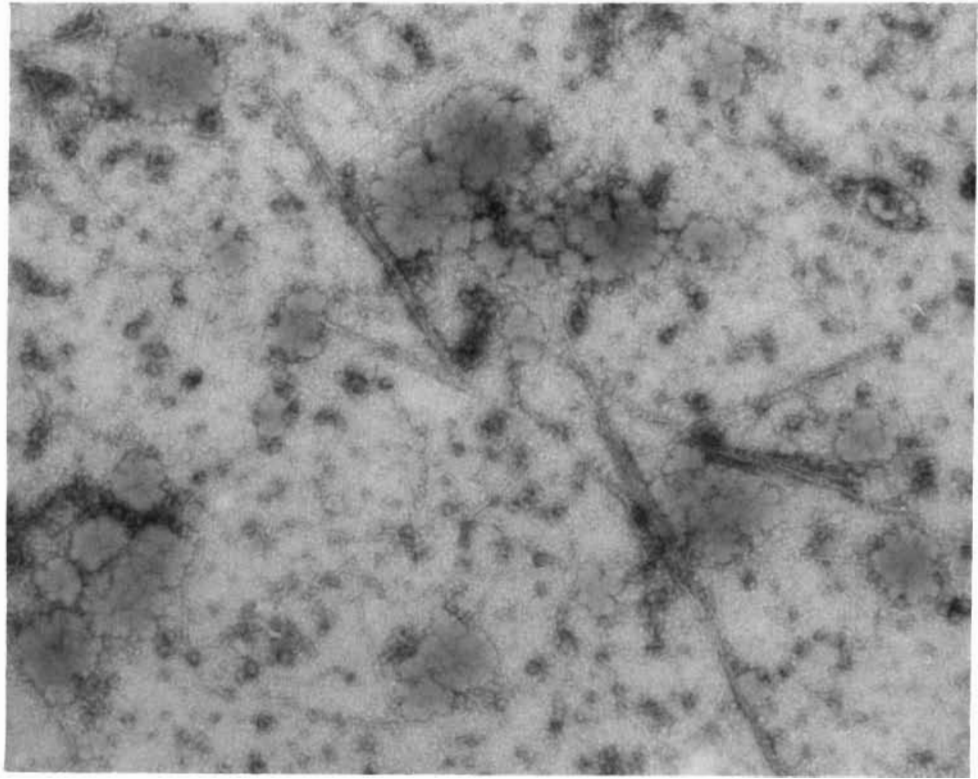
Préparations de cytoplasme démembrané réalisées à pH 6.2, en absence d'ATP. Les filaments d'actine sont nombreux et sont arrangés parallèlement en faisceaux.
—— a (photo du haut), 63 500 X; —— b (photo du bas), 63 500 X



FIGURES 44a, 44b

Préparations de cytoplasme démembrané réalisées à pH 6.2 sans ATP exogène. Les filaments d'actine sont arrangés en petits agrégats de filaments parallèles.

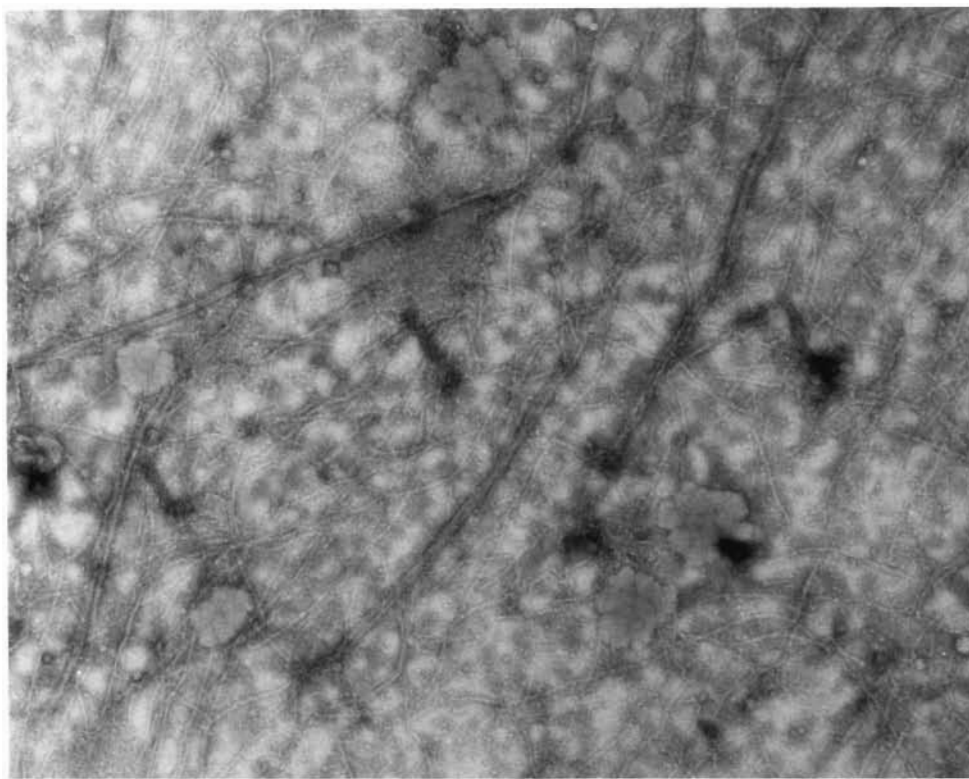
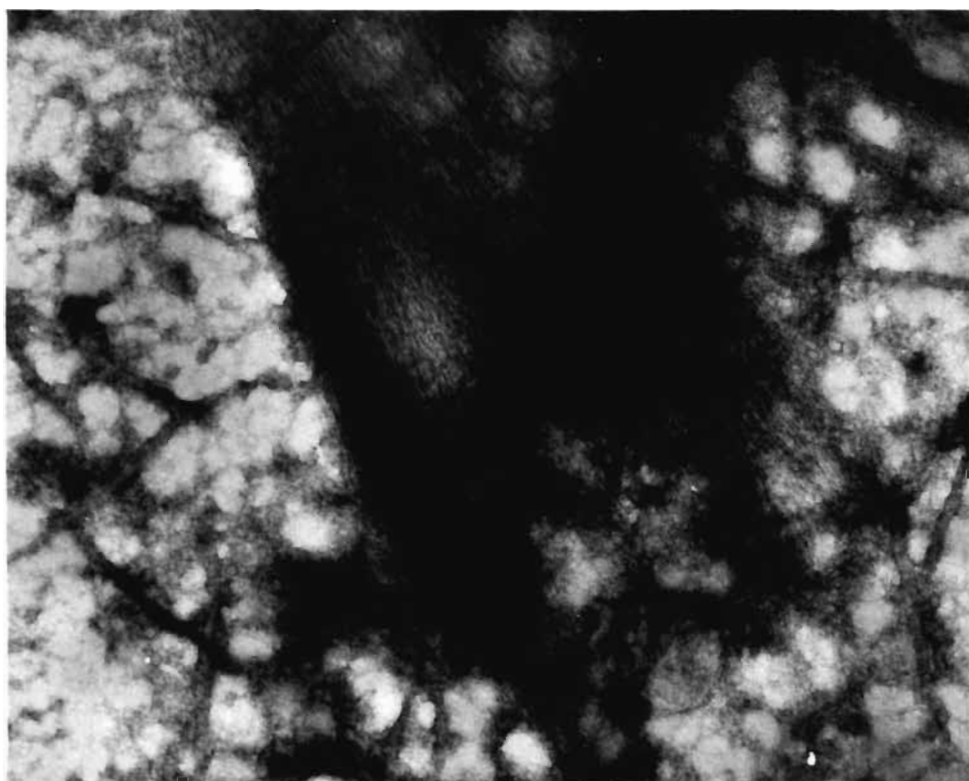
—— a (photo du haut), 63 500 X; —— b (photo du bas), 63 500 X



FIGURES 45a, 45b

Préparations de cytoplasme démembrané des cellules
· préincubées au DNP et que l'on a brisées en présence
de 1mM d'ATP exogène, à pH 6.2. Les filaments d'ac-
tine sont arrangés, soit en faisceaux ou encore en
petits agrégats.

—— a (photo du haut), 63 500 X; —— b (photo du bas),
63 500 X



sous-chapitre 6.1, pour les préparations standard .

III- Influence de l'ATP sur des préparations à pH 8.2

A pH 8.2, l'ATP a également un effet sur l'arrangement de l'actine. En absence d'ATP, nous avons observé de très nombreux filaments d'actine (Figure 46): ces filaments s'organisent en réseaux tridimensionnels (Figures 47a, 47b). Sans ATP exogène, on retrouve également ce mode d'arrangement en réseaux (Figures 48a, 48b) et l'on peut observer, en microscopie optique, des mouvements cytoplasmiques violents dans ces préparations.

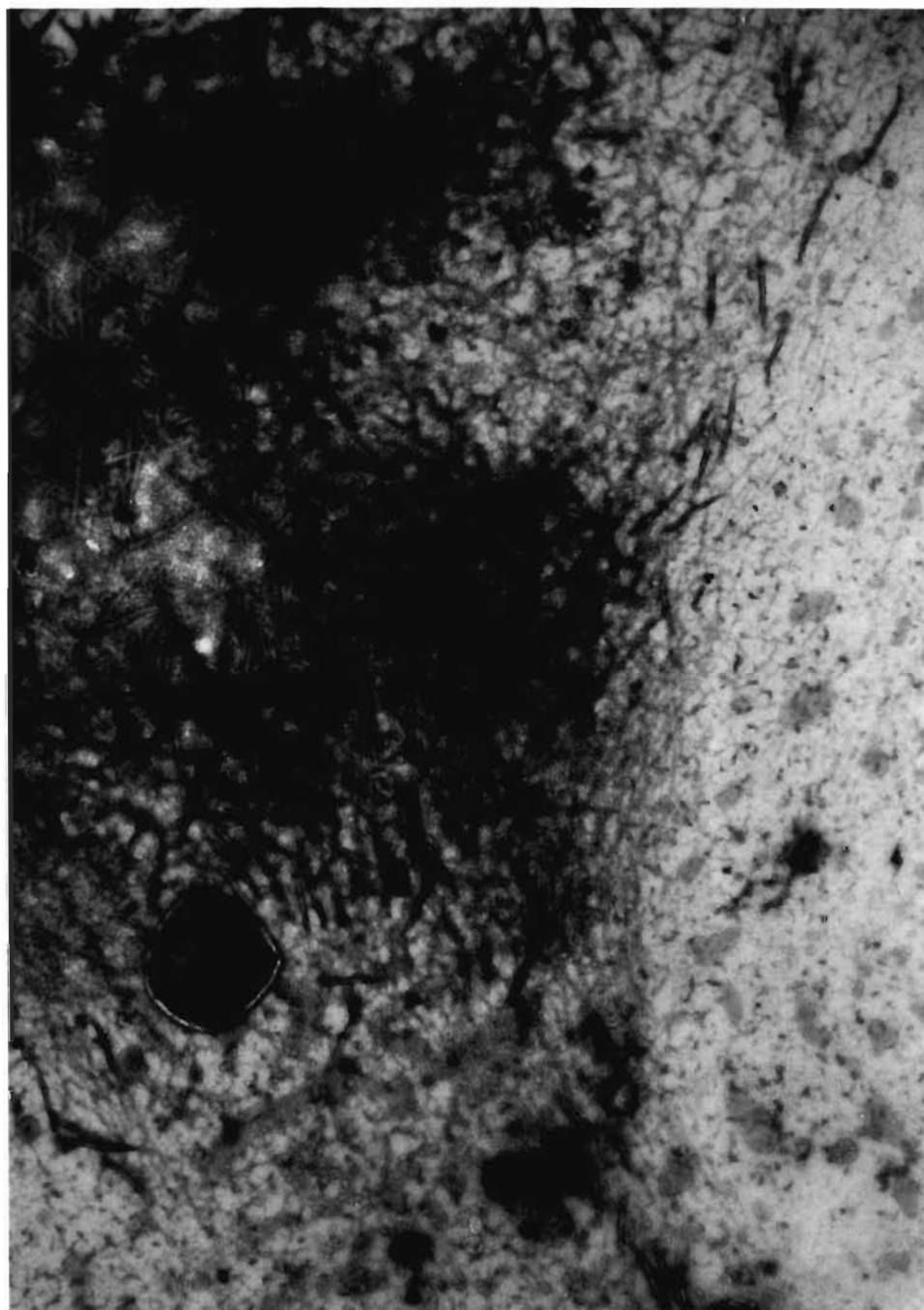
En présence de 1mM d'ATP exogène, tel que précédemment décrit au sous-chapitre 6.5, les filaments s'agrègent parallèlement en faisceaux (Figures 40a, 40b) et l'on n'observe plus, en microscopie optique, de mouvement dans le cytoplasme réalisé dans ces conditions.

Dans le cytoplasme des cellules préincubées dans 10^{-4} M DNP et brisées en présence d'ATP exogène, nous y avons observé de petits agrégats de filaments parallèles (Figures 49a, 49b).

A pH 8.2, nous n'avons noté aucun effet de la concentration d'ATP sur les filaments de myosine. Nous avons d'autre part observé à nouveau de nombreuses particules globulaires alignées à proximité de filaments dans les préparations avec ATP (Figure 50a) ou encore dispersées dans les préparations sans ATP exogène (Figure 50b).

FIGURE 46 Préparation de cytoplasme démembré réalisée à pH 8.2, en absence d'ATP. Les filaments d'actine et de myosine sont très nombreux.

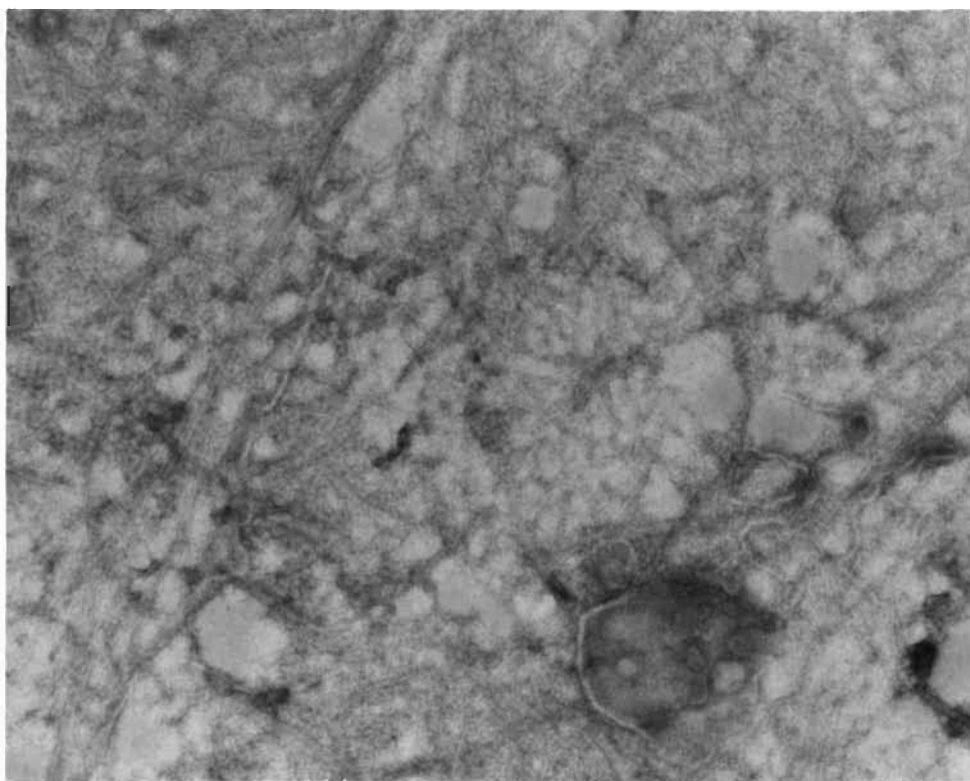
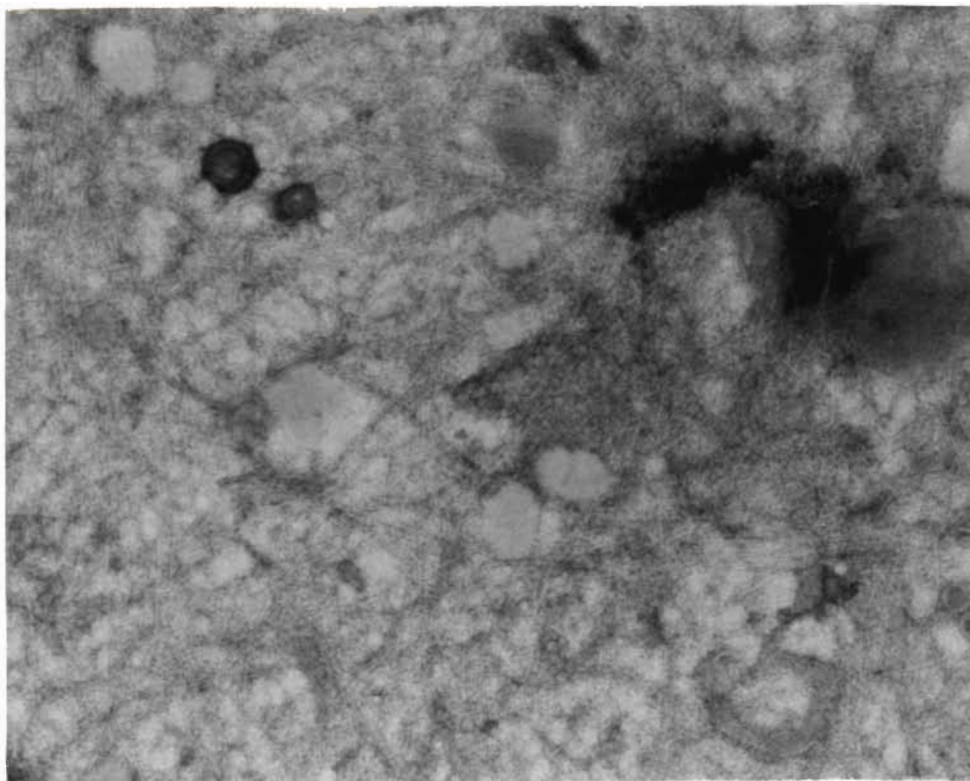
—— 20 500 X



FIGURES 47a, 47b

Préparations de cytoplasme démembrané réalisées à pH 8.2, en absence d'ATP. Les filaments d'actine sont nombreux et sont arrangés en réseaux tridimensionnels.

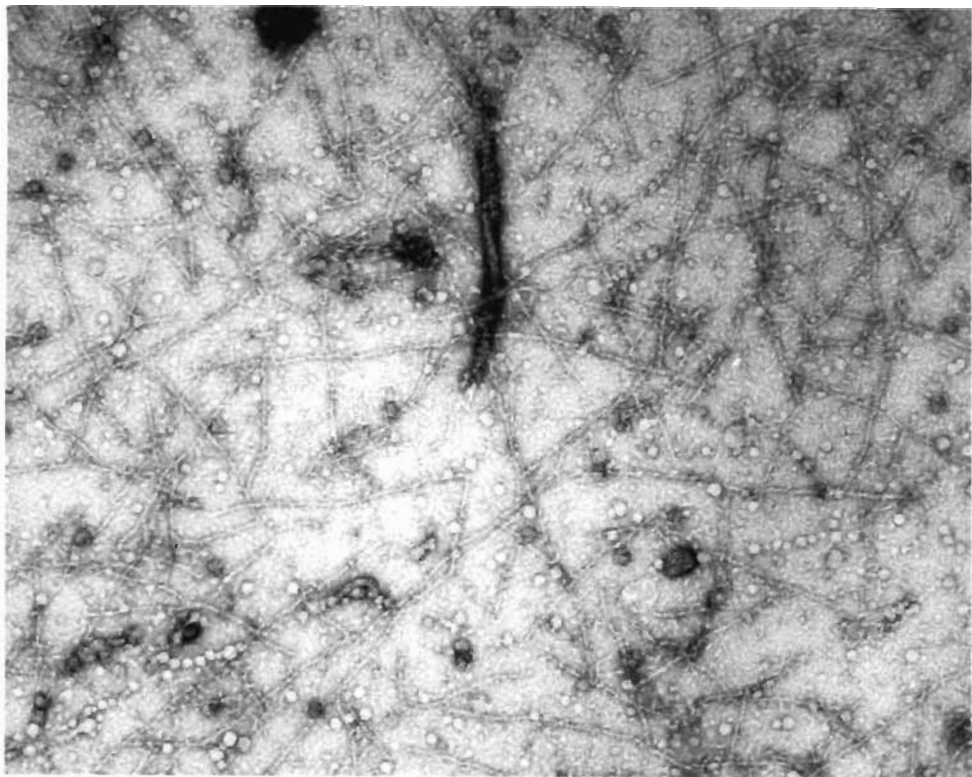
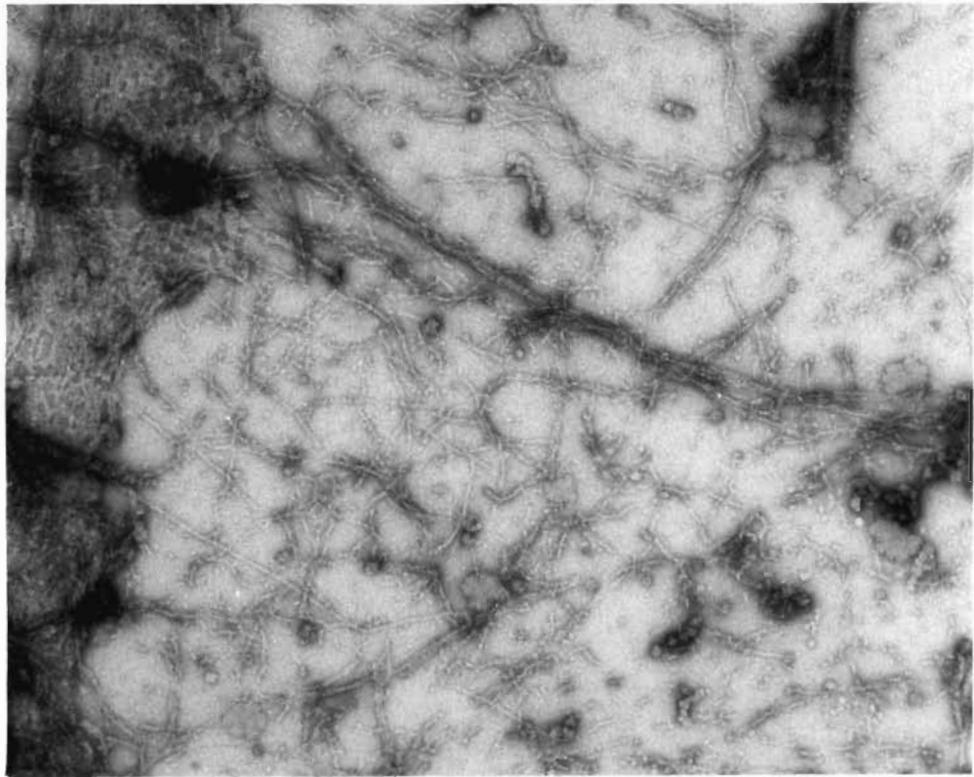
—— a (photo du haut), 63 500 X; —— b (photo du bas), 63 500 X



FIGURES 48a, 48b

Préparations de cytoplasme démembrané réalisées à pH 8.2 sans ATP exogène. Les filaments d'actine sont nombreux et sont arrangés en réseaux tridimensionnels.

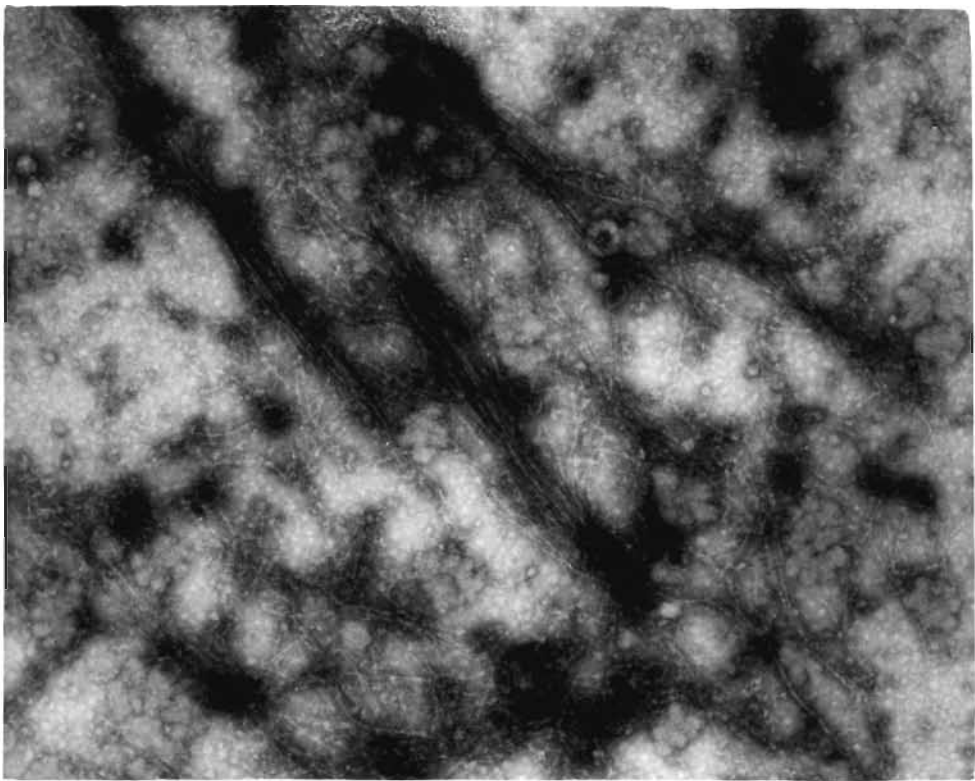
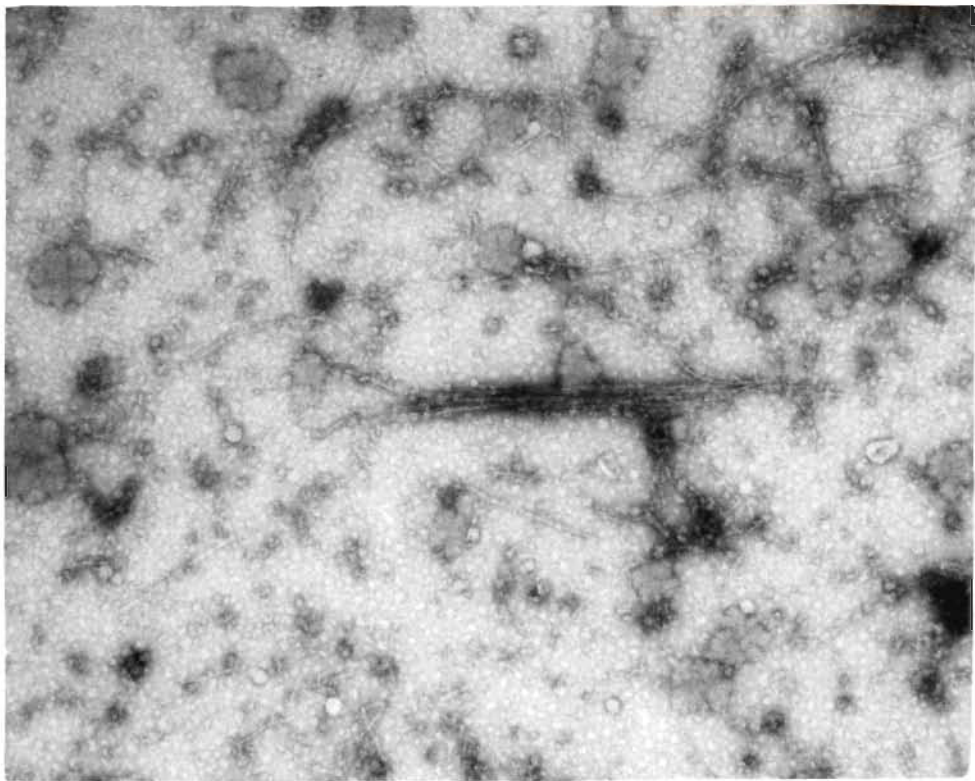
—— a (photo du haut), 63 500 X; —— b (photo du bas), 63 500 X



FIGURES 49a, 49b

Préparations de cytoplasme démembré des cellules préincubées au DNP et que l'on a brisées en présence de 1mM d'ATP exogène, à pH 8.2. Les filaments d'actine sont arrangés parallèlement en agrégats.

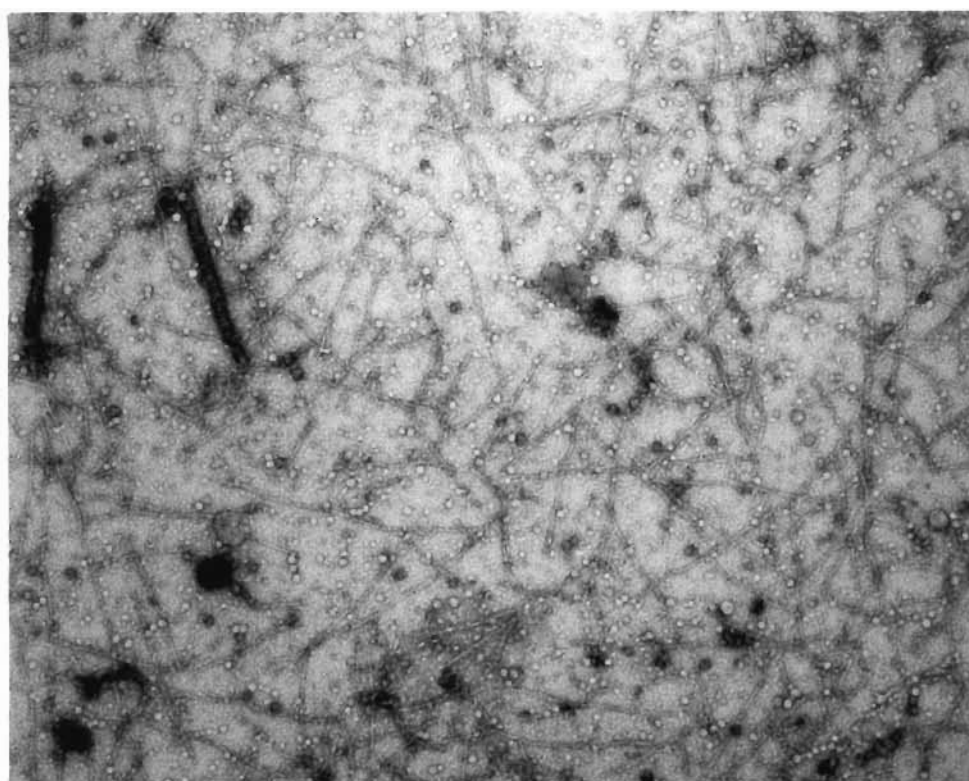
—— a (photo du haut), 63 500 X; —— b (photo du bas), 63 500 X



FIGURES 50a, 50b

Particules globulaires observées dans le cytoplasme d'Amoeba proteus, à pH 8.2. Ces particules sont généralement alignées à proximité de filaments dans les préparations avec ATP (a) , alors qu'on les retrouve dispersées dans le cytoplasme des préparations sans ATP exogène (b).

—— a (photo du haut), 28 000 X; —— b (photo du bas), 41 600 X



C- Influence de la phalloïdine sur des préparations réalisées aux pH 6.2, 7.2 et 8.2, avec ou sans ATP

Nous avons réalisé les mêmes préparations en présence de $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de phalloïdine (voir matériel et méthodes).

I- Influence de la phalloïdine sur des préparations réalisées à pH 6.2, avec ou sans ATP

Tout comme pour les expériences sans phalloïdine, nous avons mené nos observations sur des préparations réalisées sans ATP (cellules préincubées dans DNP, 10^{-4}M), des préparations réalisées sans ATP exogène, des préparations réalisées en présence d'ATP et des préparations réalisées en présence d'ATP exogène (cellules préincubées dans DNP, 10^{-4}M).

Les résultats correspondent à ceux obtenus en absence de phalloïdine:

- sans ATP: faisceaux de filaments d'actine parallèles
- sans ATP exogène: agrégats de filaments d'actine parallèles
- avec ATP: réseaux tridimensionnels d'actine
- avec ATP exogène: faisceaux ou agrégats de filaments d'actine parallèles.

Les différents modes d'agrégation induits par les changements dans la concentration d'ATP sont maintenus et parfois renforcés par une prolifération des filaments d'actine. L'action de la phalloïdine n'est toutefois pas aussi évidente à pH 6.2 que sur les préparations standard .

II- Influence de la phalloïdine sur des préparations réalisées à pH 7.2, avec ou sans ATP

L'action de la phalloïdine ($5 \times 10^{-6} \text{M}$) n'est pas modifiée par les changements dans la concentration d'ATP et l'on observe alors une prolifération des filaments d'actine qui s'arrangent en réseaux tridimensionnels, telle que nous l'avons décrite au sous-chapitre 6.2.

III- Influence de la phalloïdine sur des préparations réalisées à pH 8.2, avec ou sans ATP

A pH 8.2, les modes d'arrangements de l'actine, induits par les changements dans la concentration d'ATP, sont maintenus et généralement accentués par une plus grande quantité de filaments dans les préparations exposées à $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de phalloïdine. L'action de la phalloïdine est cependant, tout comme à pH 6.2, beaucoup plus discrète que celle observée sur les préparations à pH 7.2.

D- Conclusion

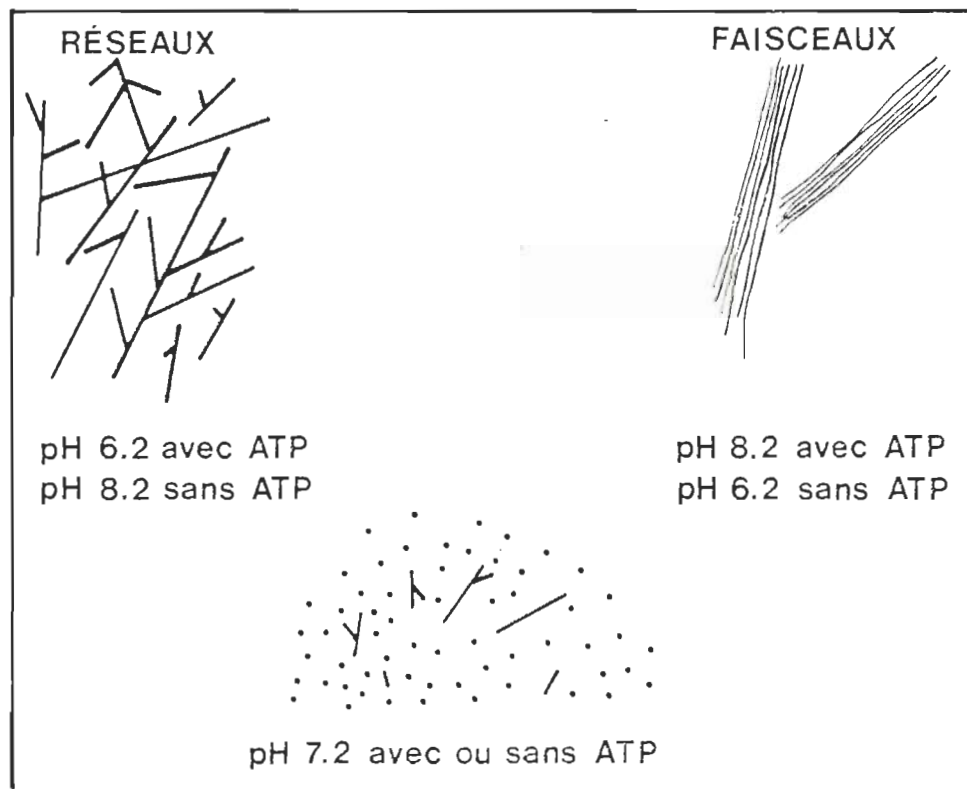
Nos résultats montrent que le pH et l'ATP influencent, de façon conjuguée, l'état de polymérisation de l'actine dans le cytoplasme d'Amoeba proteus. Le Tableau 3 résume l'influence du pH et de l'ATP sur le cytoplasme de cette amibe.

Il est important de souligner que cette influence se traduit qualitativement par la réorganisation des filaments d'actine d'un état de polymérisation dominant en un autre état de polymérisation dominant, c'est-à-dire

TABEAU 3 Action conjuguée du pH et de l'ATP sur le cytoplasme d'Amoeba proteus. Ces deux facteurs influencent de façon conjuguée l'état de polymérisation de l'actine cytoplasmique.

ACTION CONJUGUEE DU PH ET DE L'ATP SUR LE CYTOPLASME D'AMOEB PROTEUS

pH	6.2	7.2	8.2
ATP	RESEAUX TRIDI- MENSIONNELS DE FILAMENTS D'ACTINE	RARES FILAMENTS D'ACTINE	FAISCEAUX DE FILAMENTS PARAL- LELES D'ACTINE
SANS ATP	FAISCEAUX DE FILAMENTS PARAL- LELES D'ACTINE	RARES FILAMENTS D'ACTINE	RESEAUX TRIDI- MENSIONNELS DE FILAMENTS D'ACTINE



par exemple:

- à pH 6.2 sans ATP ou sans ATP exogène, le mode dominant d'organisation est l'arrangement parallèle des filaments d'actine; nous avons observé à quelques reprises des filaments arrangés en réseaux tridimensionnels.
- à pH 6.2 avec ATP, les filaments d'actine sont essentiellement arrangés en réseaux; on observe quelques rares agrégats parallèles de filaments d'actine.

.. Les expériences menées avec la phalloïdine montrent de plus que cette toxine n'induit pas une prolifération anarchique de l'actine mais bien qu'elle déplace un équilibre $G\text{-actine} \rightleftharpoons F\text{-actine}$ déjà existant dans la cellule. A pH 7.2, quelle que soit la concentration d'ATP, on observe peu de filaments d'actine: on peut alors supposer que l'actine soit essentiellement sous une forme monomérique ou encore sous forme de petits oligomères. La phalloïdine à une concentration de $5 \times 10^{-6} M$ induit, dans ces préparations, une prolifération spectaculaire des filaments d'actine: ces filaments s'arrangent en réseaux tridimensionnels. A pH 6.2 et pH 8.2, les filaments d'actine sont nombreux, quelle que soit la concentration d'ATP: l'organisation de ces filaments varie d'autre part avec la concentration d'ATP. A ces pH, la phalloïdine à une concentration de $5 \times 10^{-6} M$ ne provoque pas une prolifération spectaculaire: elle ne fait qu'accentuer les arrangements dominants induits par la présence ou l'absence d'ATP.

7. Discussion

7.1 Avantages et inconvénients d'utiliser le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus* comme modèle cellulaire

Avant de mener une discussion sur les résultats que nous venons de présenter, il est essentiel de mettre en relief les avantages et également les limites du système que nous avons étudié. Le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus* constitue en fait un système intermédiaire entre les études biochimiques des composantes cellulaires purifiées et les observations faites sur des cellules intactes.

Ce modèle cellulaire présente des avantages:

- a- la préparation du cytoplasme démembré ne nécessite pas de prétraitements chimiques importants, contrairement à la préparation des cellules pour les coupes fines par exemple;
- b- le cytoplasme démembré est un système cellulaire dont on n'extrait aucune composante cytoplasmique: il représente, d'un point de vue biochimique, un système très près de celui qui existe *in vivo*;
- c- les structures contractiles sont préservées et demeurent fonctionnelles puisqu'elles sont capables de générer des mouvements cytoplasmiques;
- d- dans le cytoplasme démembré, il n'y a plus la barrière perméable qu'est la membrane cellulaire: on peut donc facilement contrôler et étudier les

conditions chimiques nécessaires à la contractilité et au mouvement cellulaire.

Ce modèle cellulaire comporte également des inconvénients:

- a- les amibes sont comprimées entre lame et lamelle ou encore sont écrasées au potter; ce traitement mécanique est drastique et détruit probablement l'organisation globale du cytoplasme de ces cellules; on ne peut donc étudier la localisation intracellulaire des structures contractiles;
- b- toutes les observations menées sur ce modèle sont réalisées par microscopie optique et électronique: ces études sont donc qualitatives et peuvent être soumises à une certaine subjectivité.

Ce dernier inconvénient n'est pas négligeable lorsqu'il s'agit d'interpréter des résultats. De façon à le minimiser, nous procéderons souvent, comme on le verra dans cette discussion, par analogie avec des systèmes caractérisés biochimiquement. Quant à la subjectivité des observations, nous nous sommes tenus à ne présenter, pour décrire nos résultats, que les micrographies électroniques les plus représentatives d'un nombre considérable de photos.

7.2 Structures contractiles observées dans les préparations standard de cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus*

Précédemment, Gicquaud et Couillard (1971) et Taylor et collab. (1973) avaient observé le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus* préparé dans des

conditions très semblables à celles de nos préparations standard , c'est-à-dire à pH 7.2 en présence d'ATP. Ces auteurs avaient souligné la présence de filaments d'actine et de myosine dans ce modèle cellulaire. Nous avons également retrouvé ces deux types de filaments dans nos préparations standard . Certaines caractéristiques morphologiques des filaments d'actine et de myosine nous ont semblé particulièrement intéressantes: filaments d'actine ramifiés et deux types morphologiquement distincts de filaments de myosine. Nous y avons, de plus, observé d'autres structures probables du système contractile de cette amibe: filaments de taille intermédiaire, petits filaments de 3 à 4nm de diamètre, structures en forme d'"anneau" et structures ressemblant à des filaments d'actine décorés à l'HMM. Il est donc important de faire ressortir ici ces nouvelles observations.

A- Aspects morphologiques des filaments de myosine

Comme nous l'avons déjà mentionné, Gicquaud et Couillard (1971) et ultérieurement, Taylor et collab. (1973) avaient observé des filaments de myosine dans des préparations de cytoplasme démembré d'Amoeba proteus. Ces filaments étaient morphologiquement semblables aux filaments épais de type "effiloché" dans nos préparations. Nous avons de plus observé des filaments épais dont la morphologie est différente: filaments bipolaires portant des unités globulaires très semblables aux filaments asymétriques obtenus in vitro par D'Haese et Hinssen (1979) à partir de la myosine extraite d'Amoeba proteus.

Nous croyons que ce sont là deux aspects morphologiques des filaments de myosine dans cette amibe et non pas deux types distincts de filaments de

myosine. L'aspect mixte de certains filaments, c'est-à-dire montrant une extrémité effilochée et l'autre portant des unités globulaires, vient appuyer cette hypothèse. De plus, le diamètre de ces filaments est relativement le même quel qu'en soit le type morphologique.

Il nous a semblé plausible, en un premier temps, que les filaments de type "effiloché" puissent être des filaments de myosine endommagés par l'action de protéases cytoplasmiques. Les observations que nous avons menées sur des préparations "vieillies" ont cependant montré que nous ne pouvions attribuer cette morphologie à l'action de protéases cytoplasmiques.

Il est, d'autre part, possible que ces deux aspects morphologiques des filaments correspondent à deux différents états fonctionnels de la myosine. Nous suggérons que cette seconde possibilité soit retenue à titre d'hypothèse de travail pour de futures recherches: il serait en effet essentiel d'identifier les facteurs pouvant influencer la morphologie des filaments de myosine dans le cytoplasme d'Amoeba proteus et de vérifier l'action de ces facteurs sur la contractilité de cette cellule.

Taylor (1976) a montré que la myosine du muscle strié pouvait former in vitro, selon les conditions chimiques, deux types morphologiquement distincts de filaments. Quand ces conditions sont celles de l'état rigor sans ATP, les filaments de myosine synthétisés ont un aspect effiloché. Dans les conditions relaxantes avec ATP, les filaments de myosine portent des unités globulaires aux extrémités. Kaminer et Bell (1966) et Sutoh et collab. (1978) ont également observé ces deux types morphologiques des filaments de myosine musculaires in vitro sous l'effet d'une variation de pH. Ces deux morphologies

correspondent à celles que nous avons décrites pour les filaments de myosine d'Amoeba proteus. Bien que nos résultats aient montré que la concentration d'ATP ou qu'une variation de pH n'avait aucun effet sur la morphologie des filaments de myosine d'Amoeba proteus, on ne peut exclure la possibilité que quelque autre facteur module la morphologie de ces filaments et contrôle par conséquent leur fonction contractile. Par analogie avec les filaments de myosine musculaire, il est possible que les filaments effilochés de nos préparations soient des filaments actifs, à l'état "on", prêts à interagir avec l'actine et que les filaments portant des unités globulaires soient des filaments inactifs, à l'état "off", ne pouvant pas interagir avec l'actine. Cette possibilité impliquerait que, comme dans le muscle, la myosine d'Amoeba proteus participe au complexe actomyosine sous forme de filaments et que le mouvement cellulaire soit, du moins en partie, généré par une interaction cyclique (on et off) des têtes de myosine avec les filaments d'actine. De ce point de vue, on pourrait quasi justifier l'asymétrie des filaments de myosine dans Amoeba proteus. En effet, les filaments bipolaires du muscle strié, dont le mode d'agrégation est symétrique, ne peuvent déplacer axialement des filaments d'actine alors que les filaments de myosine asymétriques d'Amoeba proteus ou du muscle lisse, comme l'ont souligné Craig et Megerman (1977) et Hinssen et collab. (1978), pourraient déplacer des filaments d'actine sur des distances axiales importantes. Des filaments de myosine asymétriques auraient donc, dans un système moins structuré que le sarcomère, un plus grand potentiel de raccourcissement.

Bien qu'il soit très intéressant de considérer cette possibilité que les deux types morphologiques de filaments de myosine dans Amoeba proteus correspondent à deux états fonctionnels de la myosine dans cette cellule, nous

devons toutefois rappeler que nous travaillons sur un système complexe, très près de celui qui existe *in vivo*, alors que les systèmes auxquels nous nous référons pour établir des analogies morphologiques sont des systèmes simples: protéines musculaires purifiées. Il serait donc important d'étudier expérimentalement cette hypothèse.

B- Structures ressemblant à des filaments d'actine décorés à l'HMM

Nous avons souligné la présence de structures ressemblant à des filaments d'actine décorés à l'HMM dans nos préparations standard. La morphologie de ces structures cytoplasmiques suggère qu'il puisse y avoir un autre type de complexe actomyosine dans *Amoeba proteus*, complexe où la myosine serait fonctionnelle à l'état monomoléculaire. S'agit-il bien d'actomyosine? Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse car, si tel était le cas, on pourrait alors se demander si la myosine impliquée dans ce type de complexe correspond ou non à la myosine constituant les filaments épais que nous venons de décrire. Rappelons que de tels complexes actine-myosine monomoléculaire peuvent être fonctionnels comme l'ont montré Yano et collab. (1978). Ces auteurs ont en effet reconstitué *in vitro* un système mécanochimique, à partir d'actine et d'HMM du muscle strié de lapin, capable de générer le mouvement. Pollard (1979) a, dans ce sens, suggéré que les myosines I d'*Acanthamoeba* puissent être fonctionnelles à l'état monomoléculaire dans un complexe actomyosine. Comme on le sait, ces myosines I ne forment pas de filaments épais, contrairement à la myosine II de cette amibe, et ont des propriétés enzymatiques différentes de la myosine II.

C- Filaments de myosine dans les préparations de cytoplasme exposé à l'HMM

Nos résultats ont montré que les filaments de myosine, stables à différents pH et à différentes concentrations d'ATP, sont rares dans les préparations traitées à l'HMM. Ce n'est pas là l'effet de l'absence d'ATP puisque ces filaments sont présents dans les préparations réalisées sans ATP.

Les préparations traitées à l'HMM montrent, d'autre part, de nouvelles structures: ce sont de longs bâtons de dimensions variables. Il pourrait s'agir ici d'agrégats de filaments de myosine agencés côte-à-côte et/ou bout-à-bout. Stewart et Spudich (1979) ont observé la formation de tels agrégats *in vitro* à partir de la myosine partiellement purifiée de *Dictyostelium*: ils ont montré que cet arrangement structural peut être attribué au RNA associé à la myosine et que certains autres polyanions peuvent également induire ce type d'arrangement.

Il pourrait bien sûr s'agir d'un autre type de polymères ou encore d'artéfacts. Quoiqu'il en soit, on ne sait que très peu de choses sur l'état structural de la myosine *in vivo* et nous ne pouvons écarter la possibilité que la myosine, tout comme l'actine, puisse se retrouver sous différents états polymériques dans les cellules non musculaires.

D- Aspect morphologique des filaments d'actine

Nous avons montré, par le marquage spécifique à l'HMM, que les filaments fins (7nm) de nos préparations étaient composés d'actine. Dans les préparations standard, à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP, ces filaments sont peu

nombreux et, contrairement à la morphologie habituelle des filaments d'actine musculaire observés en coloration négative, ils sont parfois ramifiés. Ces ramifications sont évidentes dans le cas des filaments ramifiés en Y. Il ne peut alors s'agir d'artéfacts dus à la superposition de deux filaments sur la grille de microscopie. On ne peut non plus attribuer cet arrangement à l'influence de conditions particulières puisqu'on le retrouve sous toutes les conditions étudiées ici. Nous pensons donc qu'il s'agit de structures qui existent dans l'amibe *in vivo*. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés récemment par Schliwa et van Blerkom (1981) qui ont mis en évidence, par coloration négative, la présence de filaments d'actine ramifiés en Y dans d'autres cellules non musculaires. Ils sont également compatibles avec ceux obtenus, en coupe fine, par Hauser (1978), Stockem et collab. (1978) et Taylor et collab. (1976) qui ont montré que, dans les amibes, les filaments d'actine forment un treillis tridimensionnel. Néanmoins, la résolution limitée des coupes fines et les problèmes de fixation n'avaient jamais permis de voir si ces filaments étaient simplement juxtaposés ou liés chimiquement entre eux.

Le marquage des filaments d'actine à l'HMM nous a permis d'étudier la polarité des filaments ramifiés en Y. Nous avons ainsi déterminé que ces Y sont en fait formés par l'interaction de deux filaments d'actine. Le filament principal, généralement le plus long, montre une seule polarité sur toute sa longueur. Le second filament, habituellement plus court, constitue la ramification. Dans environ 75% des observations, les têtes de flèches qui décorent ce second filament pointent vers le point d'attachement sur le filament principal. Cette polarité coïncide avec celle observée par Schliwa et van Blerkom (1981) pour les filaments d'actine en Y dans des fibroblastes

d'embryon de poulet. Nous pouvons donc en déduire que les points de ramification ne constituent pas des centres de nucléation pour l'actine puisque nous aurions alors observé, dans ce cas, trois filaments montrant une même polarité par rapport aux points de ramification:

- les têtes de flèches sur ces filaments pointant toutes en direction des points de ramification comme dans le cas des filaments d'actine attachés à l'actomère dans les spermatozoïdes d'échinoderme (Tilney et Kollenbach, 1979);
- les têtes de flèches sur ces filaments pointant toutes en direction opposée aux points de ramification comme sur les filaments d'actine attachés à des membranes dans le muscle squelettique (Kelly, 1969) ou dans les oeufs d'oursin de mer (Kane, 1979).

Il semble de plus que l'interaction du filament principal avec un second filament d'actine pour constituer une ramification ne se fasse pas de façon aléatoire mais bien selon une polarité spécifique. Cela nous amène à suggérer la présence d'un facteur, peut-être une "actin-binding" protéine, dans la formation de ramifications sur les filaments d'actine. Ce facteur coordonnerait en quelque sorte l'insertion de filaments "secondaires" sur le filament principal.

Le marquage à l'HMM ne nous a pas permis d'établir s'il y avait une réelle interaction entre les filaments d'actine et les membranes dans nos préparations. La présence de filaments d'actine à proximité de fragments de membranes dans des préparations traitées à l'HMM écarte toutefois la possibi-

lité que cet arrangement soit induit sous l'influence de la phalloïdine ou la viroïdine.

E- Structures en forme "d'anneau"

Nous avons souligné la présence de structures en forme d'"anneau" dans nos préparations. Ces structures sont très semblables à l'"actin-binding" protéine isolée par Stossel et Hartwig (1975) dans les macrophages. Taylor et collab. (1976) avaient également relevé la présence de ces structures dans des extraits cytoplasmiques d'Amoeba proteus. On retrouve également des structures semblables dans d'autres cellules: Harris (1969, 1971) a isolé ces structures à partir de membranes d'érythrocytes et Kuczmarski et Rosenbaum (1979) les ont observées dans leurs préparations d'actine à partir de cerveau de poulet.

Comme nous l'avons déjà dit, à défaut d'informations biochimiques, nous ne pouvons ici qu'établir l'homologie structurale de ces particules avec l'"actin-binding" protéine des macrophages. Ce n'est pas là, bien sûr, la preuve d'une homologie biochimique et fonctionnelle de ces structures. Il faut se rappeler qu'il existe également des structures en forme d'"anneau" qui ne sont pas des structures contractiles comme par exemple la glutamine synthétase d'Escherichia coli (Lehninger, 1976).

F- Filaments de taille intermédiaire

Les filaments de taille intermédiaire n'avaient jamais été observés dans les amibes avant le présent travail. Ces filaments sont peu nombreux

dans nos préparations standard .

Leur morphologie est semblable à celle d'autres filaments du même type, les neurofilaments d'axones de Myxicola et de calmar géant (Krishnan et collab., 1979) par exemple.

On attribue généralement une fonction cytosquelettique à ce type de filaments, c'est-à-dire que ce sont des constituants structuraux plutôt que contractiles. Nous ne pouvons que nous interroger quant à leur rôle dans une cellule aussi motile qu'Amoeba proteus: il nous semble, en fait, peu probable qu'il existe des structures rigides, permanentes dans cette cellule. Leur présence dans le cytoplasme d'Amoeba proteus suggère que ces structures, de dimensions relativement importantes (10nm de diamètre et de longueur variable), puissent se transformer rapidement par un cycle de polymérisation-dépolymérisation de façon à pouvoir facilement être transportées d'un lieu cytoplasmique à un autre. Krishnan et collab. (1979) ont étudié le cycle polymérisation-dépolymérisation de neurofilaments in vitro. Ces auteurs ont montré que ces filaments sont constitués de courts polymères et que ces polymères prenaient l'aspect de particules globulaires de 11 à 12nm de diamètre sous l'action de l'urée. Schlaepfer (1977a, 1977b) avait antérieurement noté qu'un choc osmotique pouvait induire la transformation des neurofilaments en particules globulaires. Ces particules sont semblables à celles que nous avons observées à proximité des filaments de taille intermédiaire dans certaines préparations de cytoplasme démembré d'Amoeba proteus.

Les filaments de taille intermédiaire sont généralement absents dans nos préparations traitées à l'HMM. Ils sont toutefois présents dans les pré-

parations réalisées sans ATP: on ne peut donc pas attribuer leur absence à celle de l'ATP dans les préparations traitées à l'HMM. Plusieurs auteurs ont montré la sensibilité de ce type de filaments à l'action de protéases. Or, quand on réalise des préparations traitées à l'HMM, nous devons laisser réagir l'HMM et le cytoplasme un certain temps avant de le colorer négativement, de façon à permettre l'interaction actine-HMM. Il est donc possible que les filaments de taille intermédiaire soient alors détruits sous l'action de protéases cytoplasmiques.

G- Petits filaments de 3 à 4nm

Nous avons relevé la présence de petits filaments de 3 à 4nm de diamètre dans nos préparations. Ces filaments, de par leur dimension, sont difficiles à observer. Ils sont parfois regroupés et arrangés en un treillis (Figure 15): ces arrangements en facilitent alors l'observation.

Nous ne savons pas quelle est la nature de ces filaments. Morgan (1967) avait déjà signalé leur présence dans Amoeba proteus. Des filaments semblables ont été également observés dans le spasmonème de certains ciliés (Amos et collab., 1976), dans des fibroblastes d'embryon de poulet (Schliwa et van Blerkom, 1981) et d'autres cellules en culture (Webster et collab., 1978). Dans le spasmonème, ces filaments sont constitués de sous-unités de 20 000 daltons appelées spasmines: leur fonction serait essentiellement contractile et serait modulée par les ions Ca^{2+} . Dans les fibroblastes, les filaments de 3nm établiraient des ponts entre les filaments d'actine, c'est-à-dire qu'ils relieraient les filaments d'actine entre eux.

Nous ne pouvons pas établir ici la fonction de ces petits filaments dans le cytoplasme d'Amoeba proteus. Nous formulons toutefois l'hypothèse qu'ils puissent contribuer aux phénomènes motiles de cette cellule, en pontant les filaments d'actine entre eux par exemple.

H- Résumé

Le cytoplasme démembré d'Amoeba proteus est donc un système complexe. L'on y observe plusieurs constituantes probables de l'appareil contractile de cette cellule. On y retrouve deux types morphologiquement distincts de filaments de myosine: des filaments bipolaires portant des unités globulaires aux extrémités et des filaments de type effiloché sur lesquels on n'observe pas d'unités globulaires. Les filaments d'actine sont peu nombreux dans les conditions standard (pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP): ils sont parfois ramifiés.

Ce qui nous a le plus étonnés dans les préparations standard, c'est la rareté des filaments d'actine. Alors que certaines études biochimiques montrent que l'actine peut constituer jusqu'à 20% des protéines totales dans des cellules aussi motiles que les amibes, nous n'observons, dans les conditions standard, que quelques filaments d'actine dans le cytoplasme d'Amoeba proteus. Ces observations suggèrent d'une part que l'actine soit en grande partie sous forme de monomères ou encore sous forme de petits oligomères dans ces conditions et d'autre part que la présence de rares filaments d'actine suffit à maintenir les mouvements cytoplasmiques observés en microscopie optique.

7.3 Effet de la phalloïdine sur les structures contractiles d'*Amoeba proteus*

Nos résultats ont montré que la phalloïdine agit spécifiquement sur l'actine dans le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus*. Nous n'avons noté aucun effet de cette toxine sur les autres structures contractiles telles que les filaments de myosine et les filaments de taille intermédiaire. Ces résultats appuient ceux de différents laboratoires qui ont étudié l'action de cette toxine, dont celui de Prenkti et collab. (1979) entre autres.

La phalloïdine induit donc une prolifération des filaments d'actine et cet effet est fonction de la concentration utilisée. Nous pensons, en accord avec Stockem et collab. (1978), que la phalloïdine déplace l'équilibre $G\text{-actine} \rightleftharpoons F\text{-actine}$ déjà existant dans la cellule. En effet, la prolifération de filaments d'actine induite sous l'action de la phalloïdine ne semble pas être une prolifération anarchique, fortuite. Les résultats obtenus sur des préparations exposées à la phalloïdine sous différentes conditions de pH et concentrations d'ATP démontrent que cette toxine ne modifie pas l'arrangement privilégié par les conditions de pH et d'ATP mais bien qu'elle l'accentue en augmentant la proportion d'actine polymérisée. C'est pourquoi nous croyons que les filaments d'actine observés après traitement à la phalloïdine représentent des structures normalement présentes dans la cellule mais en quantités moindres.

La phalloïdine peut donc être un outil de recherche très utile dans l'étude des phénomènes motiles liés à l'actine dans *Amoeba proteus*. Dans ce sens, les observations menées à différentes concentrations de phalloïdine sur des préparations réalisées dans les conditions standard présentent beaucoup d'intérêt.

Nos résultats suggèrent que l'équilibre G-actine \rightleftharpoons F-actine puisse influencer la motilité de l'amibe. Quand l'actine est en partie polymérisée, les filaments d'actine sont nombreux et s'arrangent en un réseau tridimensionnel, un gel. Cet arrangement correspond à l'état motile de la cellule puisque c'est un arrangement que l'on retrouve quand on observe des mouvements cytoplasmiques en microscopie optique. Quand d'autre part, l'actine est quasi totalement polymérisée, les filaments d'actine sont très nombreux et s'arrangent parallèlement en faisceaux. Le cytoplasme n'est plus motile.

Ces résultats correspondent à ceux obtenus par Herman et collab. (1981) et par Taylor (1979) qui ont montré que le mouvement cellulaire est généralement associé à une distribution diffuse de l'actine et de la myosine dans le cytoplasme de cellules non musculaires, alors que l'agrégation des filaments en fibrilles correspondait à un état non motile de ces cellules.

Nous pouvons maintenant nous interroger sur le degré de polymérisation de l'actine dans les préparations standard non exposées à l'action de la phalloïdine. En se rappelant que dans ces conditions le cytoplasme est motile, il est peut-être possible que la phalloïdine, à de faibles concentrations où les mouvements cytoplasmiques ne sont pas influencés, ait une action plus "stabilisatrice" que "polymérisante": les réseaux tridimensionnels d'actine ne seraient pas stables dans les conditions standard et ne pourraient être observés en microscopie électronique. Bien que nous ne puissions écarter complètement cette possibilité, nous pensons qu'elle est peu probable. Notre étude sur l'effet du pH et de l'ATP sur le cytoplasme d'*Amoeba proteus* montre que l'arrangement de l'actine en réseaux tridimensionnels est "stable", c'est-à-dire observable en microscopie électronique par coloration négative. C'est

pourquoi il nous semble plus plausible que, dans les préparations standard , l'actine soit en grande partie à l'état de monomères ou encore de petits oligomères qui polymériseraient sous l'effet de la phalloïdine.

7.4 Effet de la viroïdine sur le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus*

A notre connaissance, nous sommes le seul laboratoire à avoir étudié l'effet de la viroïdine sur un autre système que de l'actine musculaire purifiée. Dans le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus*, cette autre toxine provoque la prolifération des filaments d'actine. Son action est spécifique à l'actine. L'effet de la viroïdine est ainsi semblable à celle de la phalloïdine.

Nous devons d'autre part souligner certaines nuances entre les effets de ces deux toxines:

- les préparations exposées à une concentration de $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de viroïdine montrent, en microscopie optique, des mouvements cytoplasmiques accélérés par rapport à ceux que l'on observe dans les préparations standard ;
- l'aspect des préparations exposées à $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de viroïdine correspond, en microscopie électronique, à celui des préparations exposées à une concentration moindre de phalloïdine, soit $2 \times 10^{-6} \text{M}$: l'action de la viroïdine est donc plus faible que celle de la phalloïdine.

Nous n'avons observé aucun changement ultrastructural qui puisse expliquer les mouvements accélérés du cytoplasme démembré sous l'effet de la

viroïdine. Ces résultats suggèrent que l'interaction actine-viroïdine soit quelque peu différente de l'interaction actine-phalloïdine dans le cytoplasme d'Amoeba proteus. Faulstich et collab. (1980), en étudiant l'interaction "actine musculaire-viroïdine" in vitro, ont également proposé que cette interaction puisse être différente de celle de la phalloïdine avec l'actine musculaire. Les virotoxines sont des peptides monocycliques, c'est-à-dire que ce sont des molécules plus flexibles que les phallotoxines dont la conformation rigide est stabilisée par un double cycle. Faulstich et collab. (1980) ont suggéré que cette flexibilité de la viroïdine puisse diminuer l'affinité de la toxine pour l'actine.

7.5 Effet d'une variation de pH sur le cytoplasme démembré d'Amoeba proteus

Les résultats de notre étude sur l'effet du pH montrent que ce facteur peut influencer la motilité du cytoplasme d'Amoeba proteus. Cette influence se traduit ultrastructuralement par des changements dans le degré de polymérisation de l'actine et, également, par différents modes d'organisation des filaments d'actine:

- quand le cytoplasme d'Amoeba proteus est motile, c'est-à-dire que l'on observe des mouvements cytoplasmiques en microscopie optique, l'actine est peu polymérisée, en grande partie à l'état de monomères ou de petits oligomères (pH 7.2, 1mM d'ATP), ou encore l'actine est en partie polymérisée, sous forme de nombreux filaments arrangés en réseaux tridimensionnels (pH 6.2, 1mM d'ATP);

- quand le cytoplasme d'Amoeba proteus est peu motile, c'est-à-dire que l'on observe peu ou pas de mouvements cytoplasmiques en microscopie optique, l'actine est en grande partie polymérisée: l'on observe de très nombreux filaments d'actine qui s'arrangent de façon parallèle en faisceaux (pH 8.2, 1mM d'ATP).

Ces observations corroborent celles que nous avons menées dans notre étude sur l'effet de la phalloïdine sur le cytoplasme d'Amoeba proteus: deux comportements motiles versus trois modes d'organisation de l'actine. Heiple et Taylor (1980) ont récemment montré que le pH intracellulaire de Chaos carolinensis pouvait varier localement de pH 6.3 à 7.4. Bien que ce ne soit là que des résultats préliminaires, ces données sont intéressantes puisque, sur une telle échelle physiologique, le pH pourrait influencer l'état polymérique de l'actine cytoplasmique et, par conséquent, moduler la motilité de l'amibe.

Nous ne pouvons que nous interroger sur les mécanismes par lesquels le pH exerce son influence sur le cytoplasme d'Amoeba proteus. Sur l'échelle de pH étudiée ici, on n'observe aucun changement dans la polymérisation de l'actine musculaire in vitro. Il est donc probable que le pH n'agisse pas directement sur la polymérisation de l'actine dans le cytoplasme d'Amoeba proteus. Il pourrait agir via quelque protéine accessoire à l'actine et sensible à la concentration en H^+ (Kawamura et collab., 1970) ou encore, comme le suggéraient Taylor et collab. (1977), il pourrait moduler la sensibilité du cytoplasme aux ions Ca^{2+} .

7.6 Effet conjugué du pH et de l'ATP sur le cytoplasme d'*Amoeba proteus*

Nous avons dû, pour des raisons techniques, rompre la membrane de nos cellules exposées au DNP avec un potter pour réaliser cette étude sur l'effet du pH et de l'ATP. Préparé au moyen du potter dans les conditions standard, c'est-à-dire à pH 7.2 en présence de 1mM d'ATP, le cytoplasme montre, en microscopie électronique, le même aspect que les préparations standard réalisées en brisant les cellules entre lame et lamelle. Nous pouvons donc affirmer que l'intégrité structurale du cytoplasme est conservée dans les préparations obtenues au moyen du potter. Le principal inconvénient d'utiliser le potter toutefois, c'est que nous n'avons pas pu observer le comportement motile du cytoplasme des cellules traitées au DNP en microscopie optique.

Nos résultats montrent que l'ATP peut également influencer la motilité d'*Amoeba proteus* et moduler l'état polymérique de l'actine de façon conjuguée avec le pH:

- quand le cytoplasme d'*Amoeba proteus* est motile, l'actine est peu polymérisée, en grande partie à l'état de monomères ou de petits oligomères, ou encore l'actine est en partie polymérisée, sous forme de nombreux filaments arrangés en réseaux tridimensionnels. On observe ce comportement motile à pH 6.2 en présence de 1mM d'ATP, à pH 7.2 avec ou sans ATP, et à pH 8.2 sans ATP;
- quand le cytoplasme d'*Amoeba proteus* est peu motile, l'actine est en grande partie polymérisée: l'on observe de très nombreux filaments d'actine qui s'arrangent de façon parallèle en faisceaux ou en agrégats. Nous avons

observé ce comportement motile à pH 6.2 sans ATP et à pH 8.2 en présence de 1mM d'ATP.

Ces résultats correspondent à ceux que nous avons obtenus en étudiant l'effet de la phalloïdine et l'effet du pH sur le cytoplasme d'Amoeba proteus. Nous ne pouvons encore ici que nous interroger sur les mécanismes par lesquels la présence ou l'absence d'ATP peut moduler la motilité du cytoplasme d'Amoeba proteus à pH 6.2 et à pH 8.2 alors qu'à pH 7.2, l'ATP n'influence ni la motilité ni l'état polymérique de l'actine.

Pollard et Ito (1970) avaient précédemment suggéré que des transformations gels d'actine \rightleftharpoons faisceaux d'actine puissent être impliquées dans la motilité d'extraits cytoplasmiques d'Amoeba proteus. Nos résultats appuient cette hypothèse. Contrairement à ces auteurs, nous ne pensons pas toutefois que ces transformations se résument en une réorganisation des filaments d'actine. Nous croyons que ces transformations impliquent à la fois une polymérisation de l'actine et une réorganisation des filaments d'actine.

Nos résultats sont également compatibles avec la théorie de "solation-contraction" proposée par Hellewell et Taylor (1979). Cette théorie suggère que l'actine de l'amibe forme in vivo un gel constitué de filaments associés entre eux par une "actin-binding" protéine; la contraction du cytoplasme impliquerait, en un premier temps, une solification c'est-à-dire la libération des filaments d'actine de l'"actin-binding" protéine et, en un deuxième temps, une interaction entre filaments d'actine et de myosine. Taylor et collab. (1977) avaient précédemment élaboré une dynamique structurale de la contractilité de l'amibe, dynamique sur laquelle repose essentiellement la théorie

de "solation-contraction". Cette dynamique comprend deux étapes et serait spécifiquement modulée par les ions Ca^{2+} :

- Etape 1: gélification ou formation d'un cytosquelette à pH 7.0, quand la concentration de Ca^{2+} est faible;
- Etape 2: solification et contraction si on élève la concentration d'ions Ca^{2+} tout en maintenant le pH à 7.0.

Nos résultats peuvent aisément s'articuler à l'intérieur de cette théorie de "solation-contraction". Nous pensons d'autre part que la contractilité de l'amibe montre, sous l'influence du pH et/ou de l'ATP, une dynamique à trois étapes:

- 1- gélification ou formation de réseaux tridimensionnels d'actine aux pH inférieurs à 7.0 en présence d'ATP et à pH 8.2 en absence d'ATP;
- 2- solification, c'est-à-dire la libération des filaments d'actine de l'"actin-binding" protéine et la dépolymérisation de ces filaments à pH 7.0 - 7.2, avec ou sans ATP;
- 3- polymérisation s'accompagnant d'une réorganisation des filaments d'actine en faisceaux de filaments parallèles à des pH supérieurs à 7.0 en présence d'ATP et à pH 6.2 en absence d'ATP.

Il serait maintenant essentiel d'établir les mécanismes régulateurs par lesquels le pH et/ou l'ATP exercent leur action. Dans ce sens, nous ne

pouvons ici expliquer la présence de faisceaux d'actine dans les préparations de cytoplasme réalisées avec des cellules préincubées au DNP et brisées en présence de 1mM d'ATP exogène, à pH 6.2. La formation de faisceaux induite par l'incubation des cellules au DNP, c'est-à-dire par l'absence d'ATP, est alors irréversible.

8. Conclusion

Cette recherche sur les structures contractiles d'Amoeba proteus nous a permis de montrer que le cytoplasme de cette amibe est un système complexe où l'on peut effectivement observer de nombreuses structures contractiles.

Dans le cytoplasme de cette amibe, nous avons essentiellement retrouvé deux types morphologiquement distincts de filaments de myosine, des filaments d'actine parfois ramifiés et des filaments de taille intermédiaire.

Dans ce cytoplasme, l'actine ne se trouve pas toujours à l'état de filaments rectilignes et parallèles. Elle peut être en grande partie à l'état de monomères, à l'état de filaments organisés en réseaux tridimensionnels ou encore à l'état de filaments arrangés parallèlement en faisceaux, selon les conditions. L'arrangement des filaments d'actine ramifiés en réseaux tridimensionnels semble difficilement compatible avec la théorie des filaments glissants de Huxley. Comme l'ont suggéré Hellewell et Taylor (1979) dans leur théorie moléculaire de "solation-contraction", nous croyons que l'actine de l'amibe forme in vivo un gel constitué de filaments associés entre eux par une "actin-binding" protéine. Nous pensons toutefois que la contraction du cytoplasme implique tout d'abord une solification, c'est-à-dire la libération des filaments d'actine de l'"actin-binding" protéine, puis un cycle dépolymérisation-polymérisation de l'actine et enfin, faisant intervenir possiblement la myosine, une réorganisation des filaments d'actine en faisceaux de filaments parallèles.

Notre recherche a montré que la phalloïdine, la viroïdine, le pH et

l'ATP pouvaient influencer l'état polymérique de l'actine dans le cytoplasme d'*Amoeba proteus* et moduler le comportement motile de ce cytoplasme. La phalloïdine et la viroïsine sont donc deux toxines qui pourraient se montrer fort utiles dans la recherche sur la motilité cellulaire. Le pH et l'ATP sont d'autre part deux facteurs physiologiques et il serait important de vérifier s'il existe des variations de pH et d'ATP à l'intérieur du cytoplasme de l'amibe.

Si l'on considère la morphologie générale de l'amibe, nous devons nous rappeler que le cytoplasme de cette cellule est subdivisé en trois régions distinctes: le cytoplasme hyalin, l'ectoplasme et l'endoplasme. Le cytoplasme hyalin, juste sous la membrane plasmique, c'est une mince couche de liquide quasi transparente: elle ne contient que de petits granules et de petites vésicules. Sous-jacent à cette première région, l'on retrouve l'ectoplasme. C'est une zone cytoplasmique rigide dont la consistance correspond à celle d'un gel et qui forme une véritable gaine autour de l'endoplasme: on y retrouve diverses inclusions (granules, vésicules et mitochondries). L'endoplasme est par ailleurs plus fluide que l'ectoplasme: sa consistance est celle d'un sol. C'est à l'intérieur de cette région que l'on peut observer, en plus de diverses inclusions, le noyau et les vacuoles. Ce n'est pas là un système statique: l'ectoplasme se transforme en endoplasme et l'endoplasme en ectoplasme selon les besoins motiles. D'un point de vue motile, l'ectoplasme est stationnaire alors que l'endoplasme est en mouvement.

En considérant ces caractéristiques morphologiques de l'amibe et les résultats que nous avons obtenus ici, nous suggérons que l'actine soit présente

sous différents états polymériques dans les diverses régions cytoplasmiques de cette cellule. Dans l'ectoplasme, l'actine pourrait être en grande partie polymérisée sous forme de filaments d'actine arrangés de façon parallèle en faisceaux. Dans l'endoplasme, l'actine serait moins polymérisée sous forme de filaments organisés en réseaux tridimensionnels dans les régions où l'ectoplasme se transforme en endoplasme et serait peu polymérisée sous forme de monomères ou de petits oligomères dans les régions endoplasmiques en mouvement. A l'extrémité du pseudopode, il y aurait à nouveau polymérisation de l'actine et réorganisation en faisceaux de filaments parallèles, donc transformation endoplasme-ectoplasme. Comme nous l'avons souligné, il est possible que l'arrangement des filaments d'actine en faisceaux corresponde à une forme d'actomyosine cellulaire. Nos hypothèses s'insèreraient donc dans la théorie de contraction frontale du mouvement amiboïde.

BIBLIOGRAPHIE

1. Agostini, B., Govindan, V., Hoffmann, W. and Wieland, Th. 1975a. Phalloidin induced proliferation of actin filaments within rat hepatocytes. *Z. Naturforsch.* 30: 793-795.
2. Agostini, B., Govindan, V. and Hoffmann, W. 1975b. Morphological changes induced by phalloidin in the rat liver. In Pathogenesis and Mechanisms of Liver Cell Necrosis, edited by D. Keppler, M.T.P. Press, Lancaster, pp. 175-192.
3. Amos, W.B., Routledge, L.M. and Yew, F.F. Calcium-binding proteins in a vorticellid contractile organelle. *J. Cell Sci.* 19 (1): 203-213.
4. Allen, R.D. 1972. Biophysical aspects of pseudopodium formation and retraction. In The biology of amoeba, edited by K. Jeon, Academic Press, New York, pp. 201-247.
5. Allen, N.S. 1974. Endoplasmic filaments generate the motive force for rotational streaming in Nitella. *J. Cell Biol.* 63:270-287.
6. Allen, N.S. 1976. Undulating filaments in Nitella endoplasm and motive force generation. In Cell motility, Book B., edited by R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 613-621.
7. Alléra, A., Beck, R. and Wohlfarth-Bottermann, K.E. 1971. Weitreichende fibrillare Protoplasma differenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplasmaströmung. VIII Identifizierung der Plasmafilamente von Physarum polycephalum als F-actin durch Anlagerung von heavy meromyosin in situ. *Cytobiologie* 4: 437-449.
8. Begg, D.A. and Rebhun, L.I. 1979. pH regulates the polymerisation of actin in the sea urchin egg cortex. *J. Cell Biol.* 83: 241-248.
9. Bennett, G.S., Fellini, S.A., Toyama, Y. and Holtzer, H. 1979. Redistribution of intermediate filament subunits during skeletal myogenesis and maturation in vitro. *J. Cell Biol.* 82: 577-584.
10. Bhisey, A.N. and Freed, J.J. 1971. Altered movement of endosomes in colchicine-treated cultured macrophages. *Exp. Cell Res.* 64: 430-438.
11. Blose, S.H., Shelanski, M.L. and Chacko, S. 1977. Localization of bovine filament antibody on intermediate (100 Å) filaments in guinea pig vascular endothelial cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 662-665.
12. Braatz-Schade, K., Haberey, M. and Stockem, W. 1973. Correlation between membrane potential, cell shape and motile activity in Amoeba proteus. *Exp. Cell Res.* 80: 456-458.
13. Bray, D. and Clive, T. 1976. Unpolymerized actin in fibroblasts and brain. *J. Mol. Biol.* 105: 527-544.

14. Bray, D. and Thomas, C. 1976. Unpolymerized actin in tissue cells. In *Cell Motility*, Book B, edited by R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 461-473.
15. Brecher, S. 1975. The occurrence and possible role of 80-100 A⁰ filaments in Pt K1 cells. *Exp. Cell Res.* 96: 303-310.
16. Brenner, S.L. and Korn, E.D. 1979. Spectrin-actin interaction. Phosphorylated and dephosphorylated spectrin tetramer crosslink F-actin. *J. Biol. Chem.* 254: 8620-8627.
17. Bretscher, A. and Weber, K. 1980. Villin is a major protein in the microvillus cytoskeleton with binds both G and F-actin in a calcium-dependent manner. *Cell* 20 (3): 839-847.
18. Brotschi, E.A., Hartwig, J.H. and Stossel, T.P. 1978. The gelation of actin by actin-binding protein. *J. Biol. Chem.* 253 (24): 8988-8993.
19. Brown, S., Levinson, W. and Spudich, J.A. 1976. Cytoskeletal elements of chick embryo fibroblasts revealed by detergent extraction. *J. Supramol. Struct.* 5: 119-130.
20. Bryan, J. and Kane, R.E. 1978. Separation and interaction of the major components of sea urchin actin gel. *J. Mol. Biol.* 125: 207-224.
21. Brysk, M.M., Gray, R.H. and Bernstein, I.A. 1977. Tonofilament protein from newborn rat epidermis. *J. Biol. Chem.* 252: 2127-2133.
22. Buckley, I.K. and Porter, R.R. 1967. Cytoplasmic fibrils in living cultured cells. A light and electron microscope study. *Protoplasma* 64: 349-380.
23. Buckley, I.K. and Raju, T.R. 1976. Form and distribution of actin and myosin in non-muscle cells: a study using cultured chick embryo fibroblasts. *J. Microscopy* 107: 129-149.
24. Buckley, I.K., Raju, T.R. and Stewart, M. 1978. Heavy meromyosin labeling of intermediate filaments in cultured connective cells. *J. Cell Biol.* 78: 644-652.
25. Buckley, I.K., Stewart, M., Raju, T.R., Irving, D.O. and Gordon, W.E. 1979. A reassessment of the distribution of F-actin in cultured cells. In *Cell Motility: molecules and organization*, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 445-466.
26. Buckley, I.K., Raju, T.R. and Stewart, M. 1981. Claims that intermediate filaments contain F-actin are unwarranted. *J. Cell Biol.* 90 (2): 309-311.
27. Burgess, D.R. and Schroeder, T.E. 1977. Polarized bundles of actin within microvilli of fertilized sea urchin eggs. *J. Cell Biol.* 74: 1032-1037.

28. Burnside, B. 1978. Thin (actin) and thick (myosin-like) filaments in cone contraction in the teleost retina. *J. Cell Biol.* 78: 227-246.
29. Calvert, R., Bennett, P. and Gratzer, W. 1980. Properties and structural role of the subunits of human spectrin. *Eur. J. Biochem.* 105: 355-361.
30. Campbell, G.R., Chamley-Campbell, J., Gröschel-Stewart, U., Small, J.V. and Anderson, P. 1979. Antibody staining of 10nm (100 Å) filaments in cultured smooth, cardiac and skeletal muscle cells. *J. Cell Sci.* 37: 303-322.
31. Carlsson, L., Nystrom, L.E., Sundkrist, I., Markey, F. and Lindberg, U. 1976. Profilin, a low-molecular weight protein regulating actin polymerability. In *Contractile systems in non-muscle tissues*, edited by S.V. Perry, A. Margreth and R.S. Adelstein, Elsevier/North Holland Biochemical Press, pp. 39-49.
32. Carlsson, L., Nystrom, L.E., Sundkrist, I., Markey, F. and Lindberg, U. 1977. Actin polymerability is influenced by profilin, a low-molecular weight protein in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* 115: 465-483.
33. Clarke, M. and Spudich, J.A. 1974. Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non-muscle cells. Isolation and characterization of myosin from amoeba of *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* 86: 209-222.
34. Clarke, M., Schatten, G., Mazia, D. and Spudich, J.A. 1975. Visualization of actin fibers associated with the cell membrane in amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72 (5): 1758-1762.
35. Clarke, M. and Spudich, J.A. 1977. Non-muscle contractile proteins; the role of actin and myosin in cell motility and shape determination. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 797-822.
36. Cobbold, P.H. 1980. Cytoplasmic free calcium and amoeboid movement. *Nature* 285: 441-446.
37. Cohen, C.M. and Foley, S.F. 1980. Spectrin-dependent and -independent association of F-actin with the erythrocyte membrane. *J. Cell Biol.* 86: 694-698.
38. Collins, J.H. and Korn, E.D. 1980. Actin-activation of Ca^{2+} -sensitive Mg^{2+} -ATPase activity of *Acanthamoeba* myosin II is enhanced by dephosphorylation of its heavy chains. *J. Biol. Chem.* 255 (17): 8011-8014.
39. Collins, J.H. and Korn, E.D. 1981. Purification and characterization of actin-activatable, Ca^{2+} -sensitive myosin II from *Acanthamoeba*. *J. Biol. Chem.* 256 (5): 2586-2595.
40. Comly, L.T. 1973. Microfilaments in *Chaos carolinensis*; membrane association, distribution and heavy meromyosin binding in the glycerinated cell. *J. Cell Biol.* 58: 230-237.

41. Condeelis, J.S. 1977. The isolation of myosin from Amoeba proteus and Chaos carolinensis. *Anal. Biochem.* 78: 374-394.
42. Condeelis, J.S. and Taylor, D.L. 1977. The contractile basis of amoeboid movement. V. the control of solation, gelation and contraction in extracts from Dictyostelium discoideum. *J. Cell Biol.* 74: 901-927.
43. Cooke, R. 1976. A filamentous cytoskeleton in vertebrate smooth muscle fibers. *J. Cell Biol.* 68: 539-551.
44. Cooke, R., Clarke, M., von Wedel, R.J. and Spudich, J.A. 1976. Supramolecular forms of Dictyostelium actin. In Cell Motility, Book B., edited by R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 575-587.
45. Craig, R. and Megerman, J. 1977. Assembly of smooth muscle myosin into sidepolar filaments. *J. Cell Biol.* 75: 990-996.
46. Craig, R. and Megerman, J. 1979. Election microscope studies on muscle thick filaments. In Motility in cell function, edited by F.A. Pepe, J. W. Sanger and V.T. Nachmias, Academic Press, New York, pp. 91-103.
47. Dahl, P. and Bignami, A. 1976. Isolation from peripheral nerve of a protein similar to the glial fibrillary acidic protein. *FEBS Lett.* 66: 281-284.
48. Dancker, P., Low, I., Hasselbach, W. and Wieland, Th. 1975. Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. Biophys. Acta* 400 (2): 407-414.
49. Davies, P., Bechtel, P. and Pastan, I. 1977. Filamin inhibits actin activation of heavy meromyosin ATPase. *FEBS Lett.* 77: 228-232.
50. Dedman, J.R., Brinkley, B.R. and Means, A.R. 1979. Regulation of microfilaments and microtubules by calcium and cyclic AMP. In Advances in cyclic nucleotide research, vol. 11, edited by P. Greengard and G.A. Robison, Raven Press, New York, pp. 131-175.
51. De Rosier, D., Mandekow, E., Silliman, A., Tilney, L. and Kane, R. 1977. Structure of actin containing filaments from two types of non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* 113: 679-695.
52. De Vries, I., Shafer, A., Faulstich, H. and Wieland, Th. 1976. Protection of actin from heat denaturation by various phallotoxins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357: 1139-1143.
53. De Vries, I. and Wieland, Th. 1978. The influence of phallotoxins and metal ions on the rate of proteolysis of actin. *Biochem.* 17: 1965-1968.
54. D'Haese, J. and Hinssen, H. 1979. Aggregation properties of non-muscle myosins. In Cell Motility: molecules and organization, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 105-118.

55. Ebashi, S. and Ebashi, F. 1964. A new protein component participating in the superprecipitation of myosin B. *J. Biochem.* 55: 604-613.
56. Ebashi, S. and Kodama, A. 1965. A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. *J. Biochem.* 58: 107-108.
57. Ebashi, S. 1972. Calcium ions and muscle contraction. *Nature* 240: 217-218.
58. Eckert, B.S., Warren, R.H. and Rubin, R.W. 1977. Structural and biochemical aspects of cell motility in amebas of *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Biol.* 72: 339-350.
59. Edds, K.T. 1979. Isolation and characterization of two forms of a cytoskeleton. *J. Cell. Biol.* 83: 109-115.
60. Faulstich, H., Buku, A., Bodenmüller, H. and Wieland, Th. 1980. Virotoxins: Actin-binding cyclic peptides of *Amanita virosa* mushrooms. *Biochem.* 19: 3334-3343.
61. Fine, R.E. and Blitz, A.L. 1976. Chemical and functional studies of tropomyosin and troponin C from brain and other tissues. In *Cell Motility*, Book B, edited by R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 785-796.
62. Forer, A. 1978. Electron microscopy of actin. In *Principles and techniques of electron microscopy, biological applications*, volume 9, edited by M.A. Hayat, Van Nostrand Reinhold Company, Amsterdam, pp. 126-174.
63. Fowler, V.M., Luna, E.J., Hargreaves, W.R., Taylor, D.L. and Branton, D. 1981. Spectrin promotes the association of F-actin with cytoplasmic surface of the human erythrocyte membrane. *J. Cell Biol.* 88: 388-395.
64. Franke, W.W., Grund, C., Osborn, M. and Weber, K. 1978a. The intermediate-sized filaments in rat kangaroo Pt K₂ cells I. Morphology *in situ*. *Cytobiologie* 17: 365-391.
65. Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M. and Weber, K. 1978b. The intermediate-sized filaments in rat kangaroo Pt K₂ cells II. Structure and composition of isolated filaments. *Cytobiologie* 17: 392-411.
66. Gabbiani, G., Montesano, R., Tuchweber, B., Salas, M. and Orci, L. Phalloidin induced hyperplasia of actin filaments in rat hepatocytes. *Lab. Invest.* 33: 563-569.
67. Geiger, B., Dutton, A.H., Tokuyasu, R.T. and Singer, S.J. 1979. The intracellular distributions of three cytoskeletal proteins in intestinal epithelial and gizzard smooth muscle cells as determined by double immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* 83: 475a (abstr.)
68. Gendreau, M., Turcotte, A., Gicquaud, C. and St-Pierre, S. 1981. Dans *Annales de l'ACFAS*, volume 48, p. 35.

69. Gergely, J. 1976. Troponin-tropomyosin dependent regulation of muscle contraction by calcium. In *Cell Motility*, edited by R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 137-149.
70. Gicquaud, C.R. et Couillard, P. 1970. Préservation des mouvements dans le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus*. *Cytobiologie* 4: 460-467.
71. Gicquaud, C.R. et Couillard, P. 1971. Préservation des mouvements dans le cytoplasme démembré d'*Amoeba proteus* II. Mise en évidence de filaments de type myosine dans les préparations. *Cytobiologie* 5: 139-145.
72. Gicquaud, C., Gruda, J. and Bégin, D. 1980. Mise en évidence par microscopie électronique de l'effet de la phalloïdine sur la protéolyse de l'actine. *Biol. Cellulaire* 37: 297-298.
73. Glenney, J.R., Jr., Kaulfus, P. and Weber, K. 1981. F-actin assembly modulated by villin: Ca^{++} -dependent nucleation and capping of the barbed end. *Cell* 24: 471-480.
74. Glenney, J.R., Jr., and Weber, K. 1981. Calcium control of microfilaments: uncoupling of the F-actin - severing and - bundling activity of villin by limited proteolysis *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 2810-2814.
75. Görecka, A., Abbsoy, M.O. and Hartshorne, D.J. 1976. The effect of phosphorylation of gizzard myosin on actin activation. *Biochem. Biophys. Rev. Commun.* 71: 325-331.
76. Götz von Olenhusen, R. and Wohlfarth-Bottermann, K.E. 1979. Evidence for actin transformations during the contraction-relaxation cycle of cytoplasmic actomyosin cycle blockage by phalloidin injection. In *Cell Motility: molecules and organization*, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and S. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 379-397.
77. Grandmont-Leblanc, A. 1979. Isolement et purification de la myosine par chromatographie d'affinité. Thèse de maîtrise présentée à l'école des gradués de l'Université Laval, 172 pages.
78. Harris, J.R. 1969. The isolation and purification of a macromolecular protein component from the human erythrocyte ghost. *Biochim. Biophys. Acta* 188: 31-42.
79. Harris, J.R. 1971. Further studies on the proteins released from haemoglobin-free erythrocyte ghosts at low ionic strength. *Biochim. Biophys. Acta* 229: 761-770.
80. Harris, H.E. and Weeds, A.G. 1978. Platelet actin: sub-cellular distribution and association with profilin. *FEBS Letters* 90: 84-88.
81. Hartwig, J.H. and Stossel, T.P. 1975. Isolation and properties of actin, myosin and a new actin-binding protein in rabbit alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 250: 5699-5705.
82. Hasegawa, T., Takahashi, S., Hayashi, H. and Hatano, S. 1980. Fragmin: A calcium ion sensitive regulatory factor on the formation of actin filaments. *Biochem* 19: 2677-2683.

83. Hatano, S. and Oosawa, F. 1966. Isolation and characterization of plasmodium actin. Biochim. Biophys. Acta 127: 488-498.
84. Hatano, S. and Oosawa, F. 1979. Cell motility and organization of actin and myosin in non-muscle cells. In Cell Motility: molecules and organization, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 675-683.
85. Hatano, S., Matsumura, F., Hasegawa, T., Takahashi, S., Sato, H. and Ishikawa, H. 1979. Assembly and disassembly of F-actin filaments in Physarum plasmodium and Physarum actinin. In Cell Motility: molecules and organization, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 87-104.
86. Hatano, S., Owaribe, K., Matsumura, F., Hasegawa, T. and Takhashi, S. 1980. Characterization of actin, actinin and myosin isolated from Physarum. Can. J. Bot. 58: 750-759.
87. Hauser, M. 1978. Demonstration of membrane associated and oriented microfilaments in Amoeba proteus by means of a Schiff base/glutaraldehyde fixative. Eur. J. Cell. Biol. (Cytobiol.) 18: 95-106.
88. Heiple, J.M. and Taylor, D.L. 1980. Intracellular pH in single motile cells. J. Cell Biol. 86: 885-890.
89. Hellewell, S.B. and Taylor, D.L. 1979. The contractile basis of ameboid movement. VI. The solation-contraction coupling hypothesis. J. Cell Biol. 83: 633-648.
90. Herman, I.M., Crisona, N.J. and Pollard, T.D. 1981. Relation between cell activity and the distribution of cytoplasmic actin and myosin. J. Cell Biol. 90 (1): 84-91.
91. Hinssen, H., D'Haese, J., Small, J.V. and Sobieszek, A.J. 1978. Mode of filament assembly of myosins from muscle and nonmuscle cells. J. Ultrastruct. Res. 64: 282-302.
92. Hitchcock, S.E., Carlsson, L. and Lindberg, U. 1975. Interaction of deoxyribonuclease I with muscle fibrous actin. J. Cell Biol. 67: 172a (abstr.).
93. Hitchcock, S.E., Carlsson, L. and Lindberg, U. 1976. Depolymerization of F-actin by deoxyribonuclease I. Cell 7: 531-542.
94. Hitchcock, S.E. 1977. Regulation of motility in nonmuscle cells. J. Cell Biol. 74: 1-15.
95. Hubbard, B.D. and Lazarides, E. 1979. Copurification of actin and desmin from chicken smooth muscle and their copolymerization in vitro to intermediate filaments. J. Cell Biol. 80: 166-182.
96. Huxley, H.E. 1969. The mechanism of muscular contraction. Science 164: 1356-1366.

97. Huxley, H.E. 1973. Muscular contraction and cell motility. *Nature* 243: 445-449.
98. Isenberg, G. and Wohlfarth-Bottermann, K.E. 1976. Transformation of cytoplasmic actin. Importance for the organization of the gel reticulum and the contraction-relaxation cycle of cytoplasmic actomyosin. *Cell and Tissue Research* 173: 495-528.
99. Ishikawa, H., Bischoff, R. and Holtzer, H. 1968. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 38: 538-555.
100. Ishikawa, H., Bischoff, R. and Holtzer, H. 1969. Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types. *J. Cell Biol.* 43: 312-328.
101. Ishikawa, H. 1979. Identification and distribution of intracellular filaments. In *Cell Motility: molecules and organization*, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 417-444.
102. Jacobson, D.N., Johnke, R.M. and Adelman, M.R. 1976. Studies on motility in *Physarum polycephalum*. In *Cell Motility*, Book B, edited by R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 749-771.
103. Jahn, T.L. and Bovee, E.C. 1969. Protoplasmic movements within cells. *Physiol. Rev.* 49: 793-863.
104. Jockush, B.M. and Isenberg, G. 1981. Interaction of α -actinin and vinculin with actin: opposite effects on filament network formation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (5): 3005-3009.
105. Kaminer, B. and Bell, A.L. 1966. Myosin filamentogenesis. Effects of pH and ionic concentration. *J. Mol. Biol.* 20: 391-401.
106. Kamiya, N. 1973. Contractile characteristics of the *myxomycete plasmodium*. *Proc. IVth. Int. Biophys. Congr. (Moscow 1972)*, Symposium paper, pp. 447-494.
107. Kamiya, N. 1979. Dynamic aspects of movement in the *myxomycete plasmodium*. In *Cell Motility: molecules and organization*, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 399-414.
108. Kane, R.E. 1975. Preparation and purification of polymerized actin from sea urchin egg extracts. *J. Cell Biol.* 66: 305-315.
109. Kane, R.E. 1976. Actin polymerization and interaction with other proteins in temperature-induced gelation on sea urchin extracts. *J. Cell Biol.* 71: 704-714.
110. Kane, R.E. 1979. Actin polymerization and function in the sea urchin egg. In *Cell Motility: molecules and organization*, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 639-652.
111. Kawamura, M., Masaki, T., Nonomura, Y. and Maruyama, K. 1970. An electron microscopic study of the 6 s component of α -actinin on F-actin. *J. Biochem.* 68: 577-580.

112. Kato, T. 1979. Ca^{2+} uptake of *Physarum* microsomal vesicles. In *Cell Motility: molecules and organization*, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 211-223.
113. Kelly, D.E. 1969. Myofibrillogenesis and Z-band differentiation. *Anat. Rec.* 163: 403-426.
114. Kendrick-Jones, J., Lehman, W. and Szent-Györgyi, A.G. 1970. Regulation in molluscan muscles. *J. Mol. Biol.* 54: 313-326.
115. Kersey, Y.M. and Wessels, N.K. 1976. Localization of actin filaments in interdonal cell of characean algae. A scanning and transmission electron microscope study. *J. Cell Biol.* 68: 264-275.
116. Kessler, D., Nachmias, V.T. and Lowey, A.G. 1976. Actomyosin content of *Physarum plasmodia* and detection of immunological cross-reactions with myosins from related species. *J. Cell Biol.* 69: 393-406.
117. Korn, E.D. 1978. Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (A review). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (2): 588-599.
118. Korn, E.D., Maruta, H., Collins, J. and Gadasi, H. 1979. Biochemical characterization of *Acanthamoeba* myosins I and II and *Acanthamoeba* myosin I heavy chain kinase. In *Motility in cell function*, edited by F.A. Pepe, J.W. Sanger and V.T. Nachmias, Academic Press, New York, pp. 403-407.
119. Kretsinger, R.H. 1979. The informational role of calcium in the cytosol. In *Advances in cyclic nucleotide research*, vol. 11, edited by P. Greengard and G.A. Robison, Raven Press, New York, pp. 1-26.
120. Krishnan, N., Kaiserman-Ahamof, I.R. and Lasek, R.J. 1979. Helical substructure of neurofilaments isolated from *Myxicola* and squid giant axons. *J. Cell Biol.* 82: 323-335.
121. Kuczmarski, E.R. and Rosenbaum, J.L. 1979. Chick brain actin and myosin. Isolation and characterization. *J. Cell Biol.* 80: 341-355.
122. Lasek, R.J., Krishnan, N. and Kaiserman-Ahamof, I.R. 1979. Identification of the subunit proteins of 10nm neurofilaments isolated from axoplasm of squid and *Myxicola* giant axons. *J. Cell Biol.* 82: 336-346.
123. Lazarides, E. and Lindberg, U. 1974. Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 4742-4747.
124. Lazarides, E. and Weber, K. 1974. Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 2268-2272.
125. Lazarides, E. and Burridge, K. 1975. α -actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in non-muscle cells. *Cell* 6 (3): 289-298.
126. Lazarides, E. and Hubbard, B.D. 1976. Immunological characterization of the 100 Å filaments from muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 4344-4348.

127. Lazarides, E., Hubbard, B.D. and Granger, B.L. 1979. Studies on the structure, interaction with actin and function of desmin and intermediate filaments in chicken muscle cells. In *Cell Motility: molecules and organization*, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 521-543.
128. Lazarides, E. 1980. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283: 249-256.
129. Lehman, W., Kendrick-Jones and Szent-Györgyi. 1973. Myosin linked regulatory systems: comparative studies. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37: 319-330.
130. Lehninger, A.L. and Carafoli, J. 1967. Energy linked in movement in mitochondrial systems. *Adv. Enzymol.* 29: 259-320.
131. Lehninger, A.L. 1976. In *Biochemistry*, second edition, Worth Publishers Inc., New York, p. 713.
132. Lehrer, S.S. 1981. Damage to actin filaments by glutaraldehyde: protection by tropomyosin. *J. Cell Biol.* 90 (2): 459-466.
133. Liem, R.K.H., Yen, S.H., Salomo, G.D. and Shelanski, M.L. 1978. Intermediate filaments in nervous tissues. *J. Cell Biol.* 79: 637-645.
134. Low, I. and Wieland, Th. 1974. The interaction of phalloidin, some of its derivatives, and of other cyclic peptides with muscle actin as studied by vicosimetry. *FEBS Lett.* 44: 340-343.
135. Lowey, S. and Cohen, C. 1962. Studies on the structure of myosin. *J. Mol. Biol.* 4: 293-308.
136. Lowey, S., Slayter, H.S., Weeds, A.G. and Baker, H. 1969. Substructure of the myosin molecule I. Sulfragments of myosin by enzymatic degradation. *J. Mol. Biol.* 42: 1-30.
137. Mabuchi, I. 1973. A myosin-like protein in the cortical layer of the sea urchin egg. *J. Cell Biol.* 59: 542-548.
138. Mabuchi, I. 1979. Role of myosin and actin in cell division of echinoderm eggs. In *Cell Motility: molecules and organization*, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 147-163.
139. Manherz, H.G., Barrington, L.J., Leberman, R. and Perang, H. 1975. A specific 1:1 G-actin: DNAase I complex formed by the action of DNAase I on F-actin. *FEBS Lett.* 60: 34-38.
140. Maruta, H. and Korn, E.D. 1977a. Purification from *Acanthamoeba castellanii* of proteins that induce gelation and syneresis of F-actin. *J. Biol. Chem.* 252: 399-402.
141. Maruta, H. and Korn, E.D. 1977b. *Acanthamoeba* cofactor protein is a heavy chain kinase required for actin activation of the Mg^{2+} ATPase activity of *Acanthamoeba* myosin I. *J. Biol. Chem.* 252 (23): 8329-8332.

142. Maruyama, K., Kaibara, M. and Fukada, E. 1974. Rheology of F-actin I. Networks of F-actin in solution. *Biochim. Biophys. Acta* 371: 20-29.
143. Maupin-Szamier, P. and Pollard, T.D. 1978. Actin filament destruction by osmium tetroxide. *J. Cell Biol.* 77:837-852.
144. Matsumura, F. and Hatano, S. 1978. Reversible superprecipitation and bundle formation of Plasmodium actomyosin. *Biochim. Biophys. Acta* 533:511-523.
145. Moore, P.L., Condeelis, J.S. Taylor, D.L. and Allen, R.D. 1973. A method for the morphological identification of contractile filaments in single cells. *Exp. Cell Res.* 80: 493-495.
146. Mori, H. and Kurokawa, M. 1980. Morphological and biochemical characterization of neurofilaments isolated from the rat peripheral nerve. *Biomedical Research* 1: 24-31.
147. Morgan, J., Fyfe, D. and Wolpert, L. 1967. Isolation of microfilaments from Amoeba proteus. *Exp. Cell Res.* 48: 194.
148. Morgan, J. 1971. Microfilaments from amoeba proteins. *Exp. Cell Res.* 65: 7-16.
149. Nachmias, V.T. 1972. Filament formation by purified Physarum myosin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69 (8): 2011-2014.
150. Nachmias, V.T. 1973. Physarum myosin: two new properties. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37: 607-612.
151. Nachmias, V.T. 1979. The contractile proteins of Physarum polycephalum and actin polymerization in plasmodial extracts. In Cell Motility: molecules and organization, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 33-57.
152. Nagai, R., Yoshimoto, Y. and Kamiya, N. 1975. Changes in fibrillar structures in the plasmodial strand in relation to the phase contraction-relaxation cycle. *Proc. Jap. Acad.* 51: 38-43.
153. Nagai, R. and Hayama, T. 1979a. Ultrastructure of the endoplasmic factor responsible for streaming in Chara internodal cells. *J. Cell Sci.* 36: 121-136.
154. Nagai, R. and Hayama, T. 1979b. Ultrastructural aspects of cytoplasmic streaming in Characean cells. *FEBS Lett.* 41: 321-337.
155. Niederman, R. and Pollard, T.D. 1975. Human platelet myosin II. *In vitro* assembly and structure of myosin filaments. *J. Cell Biol.* 67: 72-92.
156. Nonomura, Y. 1979. Myosin filament in vertebrate smooth muscle. In Cell Motility: molecules and organization, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 467-482.
157. Otto, J.J., Kane, P.E. and Bryan, J. 1979. Formation of filopodia in coelomocytes. Localization of fascin, a 58 000 dalton actin acrosslinking protein. *Cell* 17: 285-293.

158. Owaribe, K., Araki, M., Hatano, S. and Eguchi, G. 1979. Cell shape and actin filaments. In Cell Motility: molecules and organization, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 491-500.
159. Palevitz, R.A., Ash, J.F. and Hepler, P.K. 1974. Actin in the green alga, Nitella. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71: 363-366.
160. Palevitz, R.A. 1976. Actin cables and cytoplasmic streaming in green plants. In Cell Motility, Book B, edited by R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 601-611.
161. Pepe, F.A. 1979. The myosin filament: molecular structure. In Motility in Cell Function, edited by F.A. Pepe, J.W. Sanger and V.T. Nachmias, Academic Press, New York, pp. 103-117.
162. Perry, S.V. 1955. In Methods in enzymology, volume 2, edited by N.O. Kaplan and S.P. Colowick, Academic Press, New York, pp. 582-588.
163. Perry, M.M., John, H.A. and Thomas, N.S.T. 1971. Actin-like filaments in the cleavage furrow of newt egg. Exp. Cell Res. 65: 249-253.
164. Pires, E., Perry, S.V. and Thomas, M.A.W. 1974. Myosin light chain kinase, a new enzyme from striated muscle. FEBS Lett. 41: 292-296.
165. Pollard, T.D. and Ito, S. 1970. Cytoplasmic filaments of Amoeba proteus I. The role of filaments in consistency changes and movement. J. Cell Biol. 46: 267-289.
166. Pollard, T.D., Shelton, E., Weihing, R. and Korn, E.D. 1970. Ultrastructural characterization of F-actin isolated from Acanthamoeba castellanii and identification of cytoplasmic filaments as F-actin by reaction with rabbit heavy meromyosin. J. Mol. Biol. 50: 91-97.
167. Pollard, T.D. and Korn, E.D. 1971. Filaments of Amoeba proteus II. Binding of heavy meromyosin by thin filaments in motile cytoplasmic extracts. J. Cell Biol. 48: 216-219.
168. Pollard, T.D., Eisenberg, E., Korn, E.D. and Kielly, W.W. 1973. Inhibition of Mg^{++} ATPase activity of actin-activated Acanthamoeba myosin by muscle troponin-tropomyosin. Implications for the control of amoeba motility and muscle contraction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 51: 693-699.
169. Pollard, T.D. and Weihing, R.R. 1974. Actin and myosin and cell movement. Critical Reviews in Biochemistry. 2: 1-65.
170. Pollard, T.D. 1975. Functionnal implications of the biochemical and structural properties of cytoplasmic contractile proteins. In Motility and cell movement, edited by S. Inoué and R.E. Stephens, Raven Press, New York, pp. 259-287.
171. Pollard, T.D. 1976. Cytoskeletal functions of cytoplasmic contractile proteins. J. Supram. Struct. 5: 317-334.

172. Pollard, T.D., Fujiwara, K., Niederman, R. and Maupin-Szamier, P. 1976. Evidence for the role of cytoplasmic actin and myosin in cellular structure and motility. In Cell Motility, Book B, edited by R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 689-724.
173. Pollard, T.D. 1979. Cytoplasmic myosin filaments. In Motility in Cell function, edited by F.A. Pepe, J.W. Sanger and V.T. Nachmias, Academic Press, New York, pp. 117-126.
174. Pollender, J.M. and Gruda, J. 1979. Effect of phalloidin on actin proteolysis as measured by viscometry and fluorimetry. J. Can. Biochem. 57: 49-55.
175. Potter, J.D. and Gergely, J. 1974. Troponin, tropomyosin and actin interactions in the Ca^{2+} regulation of muscle contraction. Biochim. 13: 2697-2703.
176. Prenkti, M., Chaponnier, C., Renaud, J. and Gabbiani, B. 1979. Actin microfilaments, cell shape and secretory processes in isolated rat hepatocytes. Effect of phalloidin and cytochalasin D. J. Cell Biol. 81: 592-607.
- 177- Presscott, D.M. and Carrier, F.F. 1964. Experimental procedures and cultural methods for Euplotes eurystomus and Amoeba proteus. In Methods in Cell Physiology, volume 1, edited by D.M. Prescott, Academic Press, New York, pp. 85-96.
178. Raju, T.R., Stewart, M. and Buckley, I. 1978. Selective extraction of cytoplasmic actin-containing filaments with DNAase I. Eur. J. Cell Biol. (Cytobiol.) 17: 307-311.
179. Reichstein, E. and Korn, E.D. 1979. Acanthamoeba profilin. A protein of low molecular weight from Acanthamoeba castellanii that inhibits actin nucleation. J. Biol. Chem. 254 (13): 6174-6179.
180. Reinhold, M. and Stockem, W. 1972. Darstellung eines ATP-sensitiven Membransystems mit Ca^{++} -transportierender Funktion bei Amöben. Cyto-biol. 6: 182-194.
181. Rinaldi, R.A. and Baker, W.R. 1969. A sliding model of amoeboid motion. J. Theor. Biol. 23: 463-475.
182. Sarkar, S., Sreter, F.A. and Gergely, J. Light chains of myosins from white, red and cardiac muscles. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68: 946-950.
183. Schafer, A., De Vries, I., Faulstich, H. and Wieland, Th. 1975. Phalloidin interacts the inhibitory effects of actin DNAase I. FEBS Lett. 57: 51-54.
184. Schlaeper, W.W. 1977a. Immunological and ultrastructural studies of neurofilaments isolated from rat peripheral nerve. J. Cell Biol. 74: 226-240.

185. Schlaepfer, W.W. 1977b. Substructure of isolated neurofilaments. *J. Ultrastruc. Res.* 61: 149-157.
186. Schlaepfer, W.W. and Freeman, L.A. 1978. Neurofilament proteins of rat peripheral nerve and spinal cord. *J. Cell Biol.* 78: 653-662.
187. Schliwa, M. and van Blerkom, J. 1981. Structural interaction of cytoskeletal components. *J. Cell Biol.* 90 (1): 222-235.
188. Schloss, J.A., Milsted, A. and Goldman, R.D. 1977. Myosin subfragment binding for the localization of actin-like microfilaments in cultured cells: a light and electron microscope study. *J. Cell Biol.* 74: 794-815.
189. Schroeder, T.E. 1973. Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 1688-1692.
190. Schwartz, K. 1978. La myosine: une famille de protéines polymorphes. *La Recherche* 9: 683-686.
191. Sheetz, M.P., Painter, R.G. and Singer, S.J. 1976. The contractile proteins of erythrocyte membrane and erythrocyte shape changes. In *Cell Motility*, Book B, edited by R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 651-663.
192. Simard-Duquesne, N. and Couillard, P. 1962. Research of contractile proteins in *Amoeba proteus*. *Exp. Cell Res.* 28: 92-98.
193. Slayter, H.S. and Lowey, S. 1967. Substructure of the myosin molecule of muscle visualized by electron microscopy. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 58: 1611-1618.
194. Small, J. and Sobieszek, A. 1977. Studies on the function and composition of the 10nm (100 Å) filaments of vertebrate smooth muscle. *J. Cell Sci.* 23: 243-268.
195. Smith, R.A., Bell, G.E. and Ord, M.J. 1979. The effects of anaerobiosis and metabolic inhibitors on mitochondrial ultrastructure in *Amoeba proteus*. *Protoplasma* 99: 275-288.
196. Snyder, J.A. and McIntosh, R.J. 1976. Biochemistry and physiology of microtubules. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 699-717.
197. Spudich, J.A. 1974. Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non-muscle cells. II. Purification properties and membrane association of actin from amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 249 (18): 6013-6020.
198. Spudich, J.A. and Cooke, R. 1975. Supramolecular forms of actin from amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 250 (18): 7485-7491.

199. Spudich, J.A., Spudich, A. and Amos, L. 1979. Actin from the cortical layer of sea urchin eggs before and after fertilization. In Cell Motility: molecules and organization, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 165-187.
200. Stafford III, W.F. and Szent-Györgyi, A.G. 1978. Physical characterization of myosin light chains. *Biochem* 17: 607-614.
201. Starger, J.M., Brown, W.E., Goldman, A.E. and Goldman, R.D. 1978. Biochemical and immunological analysis of rapidly purified 10nm filaments from baby hamster kidney (BHK-21) cells. *J. Cell Biol.* 78: 93-102.
202. Stewart, P.R. and Spudich, J.A. 1979. Structural states of Dictyostelium myosin. *J. Supram. Struct.* 12: 1-14.
203. Stockem, W., Weber, K. and Wehland, G. 1978. The influence of microinjected phalloidin on locomotion, protoplasmic streaming and cytoplasmic organization in Amoeba proteus and Physarum polycephalum. *Cytobiol.* 18: 114-131.
204. Stossel, T.P. 1974. Phagocytosis (First of three parts). *The New England Journal of Medicine* 290 (13): 717-723.
205. Stossel, T.P. and Hartwig, J.H. 1975. Interaction between actin, myosin and an actin-binding protein from rabbit alveolar macrophages. Alveolar macrophage myosin Mg^{++} ATPase requires a cofactor for activation by actin. *J. Biol. Chem.* 250: 5706-5712.
206. Stossel, T.P. and Hartwig, J.H. 1976. Interaction of actin, myosin and a new actin-binding protein of rabbit pulmonary macrophages. *J. Cell Biol.* 68: 602-619.
207. Stossel, T.P., Hartwig, J.H., Yin, H.L. and Davies, W.H. 1979. Actin-binding proteins. In Cell Motility: molecules and organization, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and S. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 189-209.
208. Sutoh, K., Chen Chiao, Y.-C. and Harrington, W.F. 1978. Effect of pH on the cross-bridge arrangement in synthetic myosin filaments. *Biochem.* 17 (7): 1234-1239.
209. Szent-Györgyi, A.G. 1975. Calcium regulation of muscle contraction. *Biophys. J.* 15: 707-724.
210. Taniguchi, M. and Ishikawa, H. 1978. Some aspects of the structural organization of the myofibril in embryonic muscle cells. Sixth. Intern. Biophys. Cong. Abstracts: 308, Kyoto.
211. Taylor, D.L., Condeelis, J.S., Moore, P.L. and Allen, R.D. 1973. The contractile basis of amoeboid movement I. The chemical control of motility in isolated cytoplasm. *J. Cell Biol.* 59: 378-394.
212. Taylor, D.L. 1976. Quantitative studies on the polarization optical properties of striated muscle I. Birefringence changes of rabbit psoas muscle in the transition from rigor to relaxed state. *J. Cell Biol.* 68: 497-511.

213. Taylor, D.L., Rhodes, J.A. and Hammond, S.A. 1976. The contractile basis of amoeboid movement II. Structure and contractility of motile extracts and plasmalemma-ectoplasm ghosts. *J. Cell Biol.* 70: 123-143.
214. Taylor, D.L. 1977. The contractile basis of amoeboid movement IV. The viscoelasticity and contractility of Amoeba cytoplasm in vivo. *Exp. Cell Res.* 105: 413-426.
215. Taylor, D.L., Condeelis, J.S. and Rhodes, J.A. 1977. The contractile basis of amoeboid movement III. Structure and dynamics of motile extracts and membrane fragments from Dictyostelium discoideum and Amoeba proteus. In Proceedings on the Conference on Cell Shape, Alan Liss inc., New York, p. 581.
216. Taylor, D.L., Hellewell, S.B., Virgin, H.W. and Heiple, J. 1979. The solation-contraction coupling hypothesis of cell movement. In Cell Motility: molecules and organization, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 363-377.
217. Tilney, L.G., Hatano, S., Ishikawa, H. and Mooseker, M.S. 1973. The polymerization of actin: its role in the generation of the acrosomal process of certain echinoderms. *J. Cell Biol.* 59: 109-126.
218. Tilney, L.G. 1974. Non-filamentous aggregates of actin in sperm: a new state of actin. *J. Cell Biol.* 63 (2, Pt. 2): 349a (Abstr.).
219. Tilney, L.G. 1975. Actin filaments in the acrosomal reaction of Limulus sperm. *J. Cell Biol.* 64: 289-310.
220. Tilney, L.G. 1976a. The polymerization of actin III. Aggregates of non-filamentous actin and its associated proteins: a storage form of actin. *J. Cell Biol.* 69: 73-89.
221. Tilney, L.G. 1976b. Nonfilamentous aggregates of actin and their association with membranes. In Cell Motility, Book B, edited by R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 513-528.
222. Tilney, L.G., Kiehart, D.P., Sardet, C. and Tilney, M. 1978. Polymerization of actin IV. Role of Ca^{++} and H^+ in the assembly of actin and in membrane fusion in the acrosomal reaction of echinoderm sperm. *J. Cell Biol.* 77: 536-550.
223. Tilney, L.G. and Kollenbach, N. 1979. Polymerization of actin VI. The polarity of the actin filaments in the acrosomal process and how it might be determined. *J. Cell Biol.* 81 (3): 608-623.
224. Tirosh, R., Liron, N. and Oplatka, A. 1979. A proposal for the molecular basis of cytoplasmic streaming. In Cell Motility: molecules and organization, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 133-145.
225. Tuchweber, B. and Gabbiani, G. 1975. Phalloidin induced hyperplasia of actin filaments in rat hepatocytes. In The liver, quantitative aspects of structure and functions, edited by R. Preisig, J. Bitcher and G. Baumgartner, Editio Cantor, Aulendorf.

226. Ungewickell, E.P., Bennett, P.M., Calvert, R., Ohanian, V. and Gratzer, W.B. 1979. In vitro formation of a complex between cytoskeletal proteins of the human erythrocyte. *Nature (London)* 280: 811-814.
227. Wang, K., Ash, J.F. and Singer, S.J. 1975. Filamin: a new high-molecular weight protein found in smooth and non-muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 4483-4486.
228. Weber, K. 1976. Visualization of tubulin-containing structures by immunofluorescence microscopy: cytoplasmic microtubules, mitotic figures and vinblastine-induced paracrystals. In *Cell Motility*, Book A, edited by R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 403-417.
229. Weber, K. and Osborn, M. 1979. Microfilaments, microtubules and intermediate filaments in immunofluorescence microscopy. In *Cell Motility: molecules and organization*, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University Park Press, Baltimore, pp. 483-490.
230. Webster, R.E., Henderson, D., Osborn, M. and Weber, K. 1978. Three-dimensional electron microscopical visualization of the cytoskeleton of animal cells: immunoferritin identification of actin-and-tubulin-containing structures. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (11): 5511-5515.
231. Wehland, J., Osborn, M. and Weber, K. 1977. Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5613-5617.
232. Wehland, J., Stockem, W. and Weber, K. 1978. Cytoplasmic streaming in Amoeba proteus is inhibited by actin-specific drug phalloidin. *Exp. Cell Res.* 115: 451-454.
233. Weihing, R.R. and Korn, E.D. 1969. Ameba actin: the presence of 3-methylhistidine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 35: 906-912.
234. Weihing, R.R. 1976. Occurrence of microfilaments in nonmuscle cells and tissues. In *Cell Biology*, edited by P.C. Altman and D.D. Katz, Federation of American Societies for experimental biology, Bethesda, Maryland, pp. 341-356.
235. Wieland, Th. and Faulstich, A. 1978. Amatoxins, phallotoxins, phallo-lysin and antamanide. The biologically active components of poisonous Amanita mushrooms. *Crit. Rev. Biochem.* 5: 185-260.
236. Williamson, R.E. 1975. Cytoplasmic streaming in Chara: a cell model activated by ATP and inhibited by cytochalasin B. *J. Cell Sci.* 17: 655-668.
237. Williamson, R.E. and Toh, B.H. 1979. Motile models of plant cells and the immunofluorescent localization of actin in a motile Chara cell model. In *Cell Motility: molecules and organization*, edited by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato, University of Tokyo Press, pp. 339-346.
238. Wuerker, R.B. 1970. Neurofilaments and glial filaments. *Tissue and Cell.* 2 (1): 1-9.

239. Yano, M.T. and Shimizu, H. 1978. Studies of the chemo-mechanical conversion in artificially produced streaming II. An order disorder phase transition in the chemo-mechanical conversion. J. Biochem. 84: 1087-1092.
240. Yano, M.T., Yamada, T. and Shimizu, H. 1978. Studies of the chemo-mechanical conversion in artificially produced streaming I. Reconstruction of a chemo-mechanical system from acto-HMM of rabbit skeletal muscle. J. Biochem. 84: 277-283.
241. Yen, S.; Dahl, D., Schachner, M. and Shelanski, M. 1976. Biochemistry of the filaments of brain. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73: 529-533.
242. Yin, H.L. and Stossel, T.P. 1979. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium dependent regulatory protein. Nature (London) 281: 583-585.
243. Yin, H.L., Zaner, K. S. and Stossel, T.P. 1980. Ca^{2+} control of actin gelation. Interaction of gelsolin with actin filaments and regulation of actin gelation. J. Biol. Chem. 255 (19): 9494-9500.
244. Yocum, R.R. and Simons, D.M. 1977. Amatoxins and phallotoxins in Amanita species of the North Eastern United States. Lloydia 40: 178-190.